

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE DEXTRANA DE BAIXO PESO
MOLECULAR POR VIA ENZIMÁTICA, PARA
OBTENÇÃO DE FERRO-DEXTRANA

Isabel Cristina Baddini Curralero

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Parecer

Este exemplar Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
corresponde a re- Alimentos da Universidade Estadual de Campi-
dação final a ter nas para obtenção do grau de Mestre em Enge-
defendida por nharia de Alimentos.

Isabel Cristina Baddini Curralero e aprovada
pelo Conselho Julgador em 24.03.93.

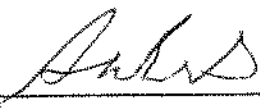


u

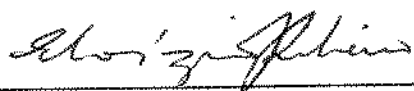
BANCA EXAMINADORA



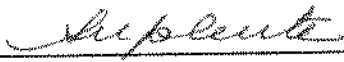
Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
(Orientador)



Prof. Dr. Arlindo Moreira Sales
(membro)



Prof. Dr. Eloísio Júlio Ribeiro
(membro)



Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore
(membro)

Campinas, 24 de março de 1993

Dedico este trabalho ao meu filho
THIAGO que trouxe tanto amor e
alegria à minha vida

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho por sua orientação, apoio e tolerância durante a realização deste trabalho.

Ao Sr. José Carlos Gerez e à Anne F. Mayer pelo apoio e incentivo.

Ao Sr. Artur Luiz Rocha e Zilda Maria Braga pela ajuda inestimável no desenvolvimento da metodologia analítica.

Ao Akira pela alegria e dedicação com que me ajudou no desenvolvimento experimental.

Ao Airton pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

Ao Pedro pela compreensão e amor.

A todos os colegas e amigos da CODETEC que direta ou indiretamente me ajudaram no desenvolvimento e redação deste trabalho.

À Fátima, do Laboratório de Bioengenharia, pelo carinho nas valiosas discussões.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e todos os professores que me auxiliaram com seus conhecimentos e compreensão.

À Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos (ABIA) pelo custeio da confecção desta tese.

À Companhia de Desenvolvimento Tecnológico (CODETEC) por permitir a realização e publicação deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

INDICE

Resumo	vi
Summary	vii
I. INTRODUÇÃO	01
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
1. GENERALIDADES	04
2. DEXTRANA	09
2.1. Produção	09
2.2. Redução de Peso Molecular	15
2.3. Propriedades	22
2.4. Usos	24
3. DEXTRANA-SACARASE	29
3.1. Produção	29
3.2. Propriedades	34
3.3. Mecanismo de Ação Catalítica	40
3.4. Fatores que afetam o peso molecular da dextrana na síntese enzimática	48
4. FERRO-DEXTRANA	60
4.1. Características	60
4.2. Utilização	62
4.3. Mercado	62
III. MATERIAL E MÉTODOS	65
1. MICRORGANISMO	65
2. MEIOS DE CULTURA	66
3. CONDIÇÕES DE CULTURA	67
4. CONDIÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO	68
a) Obtenção do concentrado enzimático	68
b) Obtenção de dextrana	68

5. MÉTODOS ANALÍTICOS	70
a) Crescimento celular	70
b) Determinação de açúcares redutores - Método DNS ...	71
c) Determinação da atividade enzimática	72
d) Determinação de Dextrana	73
e) Determinação de glicose - Método glicose-oxidase/ peridoxidase	75
f) Cromatografia de permeação em gel (HPLS)	76
g) Estimativa das quantidades relativas das dextra- nas de PM baixo, intermediário e alto	82
IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES	84
1. FERMENTAÇÃO	84
1.1. Fermentação em Batelada	84
1.2. Fermentação em Batelada Alimentada	88
2. REAÇÃO ENZIMÁTICA	90
2.1. Aspectos cinéticos	92
2.1.1. Influência da concentração de sacarose ...	92
2.1.2. Influência da concentração de maltose	97
2.2. Obtenção de dextrana de baixo peso molecular	102
2.2.1. Reações com uso exclusivo de sacarose	102
2.2.2. Reações com "acceptor"	134
3. ASPECTOS ECONÔMICOS E DE PROCESSO	142
3.1. Reação enzimática com maltose	142
V. CONCLUSÕES	145
VI. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	147
BIBLIOGRAFIA	148

RESUMO

A produção de dextrana de baixo peso molecular através da reação enzimática com dextrana-sacarase bruta de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F foi estudada, utilizando várias concentrações de sacarose e maltose como aceptor .

Na ausência de maltose, o aumento da concentração de sacarose levou à formação de polissacarídeos de baixo peso molecular, além da dextrana nativa. O produto de reação nestes casos é bastante heterogêneo, havendo ainda redução do rendimento de dextranas totais com o aumento da concentração inicial de sacarose.

Com a utilização de maltose foi detectado um aumento na produção das dextranas de baixo peso molecular, proporcional ao aumento do coeficiente R ($[maltose]/[sacarose]$) e da concentração de sacarose, com rendimentos em dextranas totais superiores àqueles obtidos na ausência de maltose. O melhor resultado foi obtido com concentração de sacarose de 300 g/l e de maltose de 6 g/l ($R = 0,02$). O rendimento alcançado foi de 77% em dextranas totais, com 86% destas correspondendo a uma espécie com peso molecular médio em torno de 4.000 daltons.

SUMMARY

The production of low molecular weight dextran during enzymatic reaction with raw dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F in different concentrations of sucrose and maltose as acceptor was studied.

In the absence of maltose, the increase of sucrose concentration resulted both low molecular weight polysaccharide and native dextran formation. The product was very heterogeneous and with the increase of sucrose concentration, the yields of total dextrans decreased.

Using maltose as acceptor, it was observed an increase in the production of low molecular weight dextran, proportionally to the increase of the R ratio ($[\text{maltose}]/[\text{sucrose}]$) and sucrose concentration. The yields of total dextrans was higher than that obtained in the absence of maltose.

The best result was obtained with a sucrose concentration of 300 g/l and 6 g/l of maltose ($R = 0,02$). The dextran yield was 77%, with 86% of the product mixture corresponding to a low molecular weight dextran with an average molecular weight near to 4.000 daltons.

1. INTRODUCAO

A dextrana utilizada para produção de ferro-dextrana é um homopolissacarídeo de origem bacteriana composto quase exclusivamente de resíduos glicosídeos, sendo produzido principalmente por bactérias do género *Leuconostoc*, espécies *mesenteroides* e *dextranicum*. Os trabalhos mais recentes com dextrana, principalmente visando sua utilização farmacêutica, foram conduzidos com a linhagem *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512-F. A dextrana obtida através da enzima produzida por este microrganismo, apresenta 95% das ligações glicosídicas do tipo α -1,6, não sendo portanto muito ramificada e bastante solúvel em água, propriedades estas que lhe garante grande gama de aplicações comerciais.

Foi no início da década de 50 que a dextrana surgiu como alternativa para a complexação de ferro, na tentativa de diminuição dos efeitos tóxicos encontrados no uso intramuscular. Apesar dos problemas ainda encontrados, principalmente quando usado por via intramuscular por tempo prolongado, vários melhoramentos vêm sendo feitos nas formulações de ferro-dextrana, como controle mais rigoroso da quantidade de ferro complexado e peso molecular mais adequado da dextrana utilizada.

O peso molecular da dextrana utilizada na complexação com ferro é de fundamental importância na formação e apresentação do produto final. O peso molecular médio da ferro-dextrana de uso veterinário deve estar na faixa de 5.000 ± 2.500 daltons, sendo este limite ainda mais estreito no caso do produto para uso humano.

A dextrana é produzida pela ação da enzima dextran-sacarase sobre sacarose, havendo liberação de frutose. Industrialmente, esta síntese pode ser efetuada na presença ou não das células bacterianas. O polissacarídeo pode ser produzido durante o crescimento celular, com utilização da sacarose existente no meio de cultura. Por outro lado, a enzima pode ser obtida em condições controladas de temperatura, pH, e concentração de sacarose, com a formação de quantidades mínimas de dextrana, e posteriormente usada na forma livre ou imobilizada para a síntese de dextrana na ausência do microrganismo.

A síntese "in vitro", devido à maior possibilidade de controle e conseqüentemente à maior facilidade de otimização, tem sido o processo mais utilizado e o mais estudado.

A produção industrial de ferro-dextrana é feita a partir da dextrana nativa, que é submetida a um processo de hidrólise ácida para redução do peso molecular até valores em torno de 5.000, seguida da complexação com ferro.

Vários estudos sugerem a possibilidade da obtenção de dextrana com peso molecular reduzido, durante a reação enzimática, sem necessidade de hidrólise posterior. Isto pode ser conseguido, já que o peso molecular da dextrana sofre grande influência das condições de síntese, principalmente no que diz respeito às concentrações dos açúcares presentes no meio. Além do aumento da concentração de sacarose, outro fator que favorece a redução do peso molecular é a presença de açúcares aceptores, como maltose e isomaltose além de dextranas de baixo peso molecular. O uso destes aceptores, principalmente maltose e dextranas de cadeia curta vem

sendo estudado na obtenção da dextrana clínica, usada como expansor de plasma sanguíneo.

A opção da maltose como acceptor neste estudo da reação enzimática controlada, foi devido ao fato deste dissacarídeo ser classificado como um dos aceptores mais eficientes, juntamente com a isomaltose, além de sua disponibilidade no mercado interno e da grande quantidade de estudos anteriores sobre o assunto.

O objetivo deste trabalho é um estudo visando estabelecer condições adequadas para reação enzimática, a fim de obter ao final desta, dextranas de peso molecular apropriado para complexação com o ferro. A avaliação do peso molecular médio da dextrana foi feita em produtos de reação com diferentes concentrações de sacarose e maltose, como acceptor, usando enzima bruta.

II- REVISAO BIBLIOGRAFICA

1. GENERALIDADES

As dextranas começaram a ser estudadas há mais de um século atrás, com a observação de formação de películas e aumento da viscosidade durante processos de fabricação de vinhos e açúcar de beterraba e cana (ALSOP (1983)), causando problemas como diminuição no rendimento, dificuldade na cristalização do açúcar, além da obstrução e perda da eficiência de filtros, tubulações e outros equipamentos (NEELY (1960)).

Em 1861, Pasteur (segundo ALSOP (1983) e DE BELDER (1987)) já havia demonstrado que a formação dessas películas em caldos ricos em sacarose tinha como causa uma ação microbiana, sem no entanto ter identificado esse agente. Na mesma época, Van Tieghem (segundo AQUARONE (1975) e DE BELDER (1987)) isolou e descreveu a bactéria causadora de tais películas, dando-lhe o nome de *Leuconostoc mesenteroides*.

Em 1874, SCHEIBLER descobriu que o misterioso espessamento dos caldos de açúcar de cana e beterraba, era devido à presença de um carboidrato com fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$ com rotação óptica positiva (dextro-rotatória), ao qual denominou "dextrana". (segundo ALSOP (1983) e NEELY (1960))

Hoje sabe-se que a fórmula molecular correspondente ao polissacarídeo é $(C_6H_{10}O_5)_n$, constituindo-se em um polímero de glicose produzido por vários microrganismos, com diferentes estru-

turas e propriedades. Atualmente o termo dextrana é usado para designar toda uma classe de polissacarídeos bacterianos extra celulares, compostos quase que exclusivamente de resíduos glicosídicos ligados predominantemente por ligações α -1,6.

Muitas bactérias sintetizam dextrana extracelularmente em meio contendo sacarose. Estas bactérias pertencem à família Lactobacillaceae e mais especificamente aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, (ALSOP (1983); DE BELDER (1987) e SIDEROTHAM (1974)) estando alguns membros deste grupo ligados à formação da placa bacteriana cariogênica, na superfície dos dentes. Os integrantes do gênero *Lactobacillus* e *Leuconostoc* são comumente encontradas como contaminantes na indústria açucareira. As principais bactérias produtoras de dextrana pertencem ao gênero *Leuconostoc*, espécies *mesenteroides* e *dextranicum*, sendo a linhagem NRRL B 512 F de *Leuconostoc mesenteroides* a única de interesse comercial devido às características da dextrana por ela produzida, quais sejam solubilidade em água e pequena quantidade de ramificações, sendo uma cadeia praticamente linear com pequenas ramificações. Segundo análises efetuadas por BOVEY (1959), concluiu-se que mais de 80% das ramificações possuem apenas uma unidade de glicose ligadas principalmente por ligações α 1,3 (JONES & WILKIE (1959)) e α 1,4, havendo proporção bastante reduzida de ramificações longas. A estrutura molecular de uma molécula de dextrana é apresentada na Figura 1.

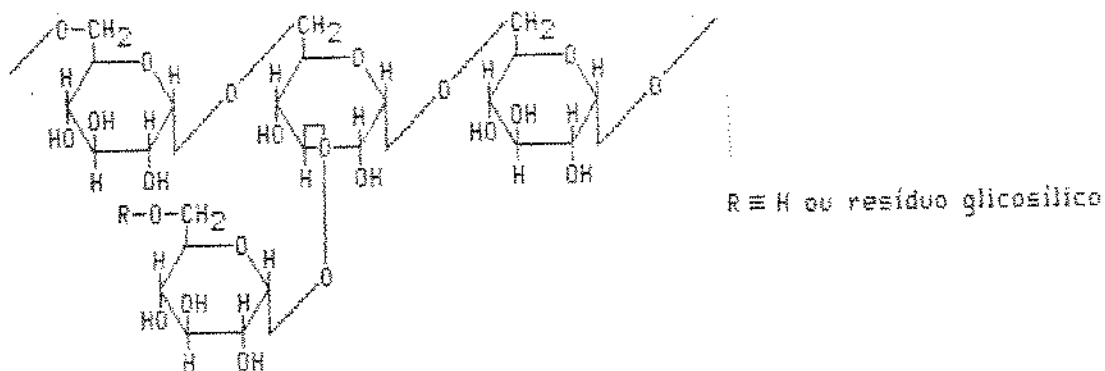


Figura 1: Estrutura de uma molécula de dextrana

Quando se fala em produção de dextrana nativa de alto peso molecular (acima de 1×10^6) é importante salientar que esta não é um produto direto da fermentação bacteriana na presença de sacarose, mas provém da ação da enzima dextrana-sacarase produzida pelo microrganismo sobre a sacarose existente no meio. A dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F, assim como de outras linhagens é extracelular e classificada como uma transglicosidase, com o nome de sacarose-1,6- α -D-glucana 6- α -glicosiltransferase (E.C. 2.4.1.5), o que indica que a enzima catalisa exclusivamente a síntese de cadeias compostas de unidades α -D-glicopiranosil unidas por ligações α -1,6 a partir da sacarose. A existência de linhagens de *Leuconostoc* que produzem dextranas insolúveis como a NRRL B 1299 estudada por SMITH (1960), com ligações tipo α -1,6 e α -1,3 alternadas (ALSOP (1983)) e de diferentes tipos

de ramificação como verificado por SIDEBOTHAM (1974), levou alguns autores a propor a existência de uma família de dextrana-sacarases, além de evidenciar a dependência entre estrutura e linhagem utilizada na produção.

A unidade de dextrana-sacarase (UDS) foi definida como a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana em uma hora, liberando 0,52mg de frutose, a 30°C em tampão pH 5,2 numa concentração de sacarose de 10% (HEHRE (1955)).

LAWFORD, KLINGERMEN & WILLIAMS (1979) expressaram a atividade da enzima como a quantidade de açúcar redutor produzido em $\mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$ a 30°C e pH 5,5.

ROBYT & WALSETH (1979) definiram a atividade como a quantidade de enzima necessária para incorporar 1 μmol de D-glicose no polissacarídeo em um minuto a 25°C e pH 5,0.

KABOLI e REILLY (1980) usaram a definição de unidades internacionais (UI), definida como a quantidade de enzima que libera μmol de açúcar redutor em um minuto a 30°C e pH 5,2.

A maioria dos trabalhos se utiliza da definição de UDS, embora em estudos mais recentes a Unidade Internacional venha sendo utilizada (1 UI = 20,27 UDS).

Os primeiros trabalhos na produção de dextrana na ausência de células foram realizados por HEHRE (1941) e Sugg (segundo NEELY (1960)), sendo proposta a seguinte equação geral:



HEHRE (1946) estabeleceu ainda que a reação atinge 99% de conversão da sacarose, sendo essencialmente não reversível.

A partir de estudos em torno da reação enzimática, percebeu-se que são muitos os fatores que afetam o peso molecular da dextrana produzida e o comportamento cinético da enzima, como temperatura, (BRASWELL et al. (1962)) concentração enzimática (ALSOP (1983); BRASWELL et al. (1962) e HELLMAN et al (1955)) concentração inicial de sacarose (ALSOP (1983), ROBYT & EKLUND (1982)), TSUCHIYA et al. (1953) e TSUCHIYA et al. (1955)) e a presença de outros açúcares como maltose e isomaltose, chamados aceptores.

Recentemente o desenvolvimento de técnicas cromatográficas para a análise de carboidratos, foi de importância fundamental no estudo quali e quantitativo em diferentes condições de síntese enzimática. Oligossacarídeos podem ser separados em colunas de troca iônica ou sílica modificada. Os produtos da reação sacarose/dextrana-sacarase podem ser analisados com boa precisão com técnicas de cromatografia de exclusão molecular, sendo possível inclusive obter-se a distribuição de peso molecular do produto obtido. Novos enchimentos poliméricos rígidos como os da Toyo Soda (TSKPW gel) são disponíveis em diversos intervalos de exclusão molecular, possibilitando análises rápidas e com bom nível de precisão.

Através destas técnicas analíticas, a otimização de processos para obtenção de dextranas de baixo peso molecular pelo controle das condições da síntese enzimática ficou bastante simplificada.

2. DEXTRANA

2.1. PRODUÇÃO

As dextranas são sintetizadas a partir da sacarose por um grande número de organismos. JEANES, HAYNES & WILHAM (1956) caracterizaram a dextrana produzida por 4 tipos de *Leuconostoc mesenteroides*, estabelecendo a dependência entre a linhagem e as propriedades da dextrana obtida. WHITESIDE - CARLSON & W. CARLSON (1949) estudaram as exigências vitamínicas de várias linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc dextranicum* para crescimento e produção.

Apesar do grande número de bactérias produtoras de dextrana, a mais utilizada industrialmente é a *Leuconostoc mesenteroides*, particularmente as linhagens B-512 e B-512 F (DE BELDER (1987)). A obtenção de dextrana a partir destas linhagens pode ser conduzida por dois processos, um convencional onde a produção se dá durante o crescimento, e a síntese enzimática que utiliza o extrato enzimático obtido na fermentação (AQUARONE (1975) e ALSOP (1983)).

• Processo convencional

Tradicionalmente a dextrana é produzida durante o crescimento do microrganismo, constituindo-se num processo bastante simples, onde apenas o controle de temperatura é efetuado. A dextrana é obtida do caldo fermentado através de precipitação com solventes orgânicos, principalmente etanol e metanol e purificada

através de processos de ressolubilização e precipitação (AQUARONE (1975) e JEANES et al. (1956)). A evolução dos parâmetros neste tipo de processo está representada na Figura 2.

A Tabela 1, apresenta alguns exemplos de formulação do meio de cultura utilizados na produção de dextrana por *Leuconostoc mesenteroides*.

Além dos estudos de HOLLÓ & LÁSZLÓ (1971) para a melhor concentração de sacarose a ser utilizada, ALSOP (1983) propõe a concentração de 170 g/l como ótima a ser utilizada em produção industrial.

Segundo JEANES, WILHAM & MIERS (1948), a aeração durante a produção é desfavorável à formação de dextrana.

Tabela 1. Meios de cultura utilizados na produção de dextrana pelo processo convencional.

Nutrientes	Concentração (g/l)		
	HOLLÓ & LÁSZLÓ (1971)	JEANES et al. (1954)	VELJKOVIC et al. (1988)
Peptona	10,00	—	—
KCl	1,00	—	1,00
Na ₂ HPO ₄	5,50	—	5,00
Na ₃ PO ₄	0,75	—	—
Extrato de levedura	3,30	5,50	15,00
Sacarose	50,00	100,00	125,00
Triptona	—	2,50	—
K ₂ HPO ₄	—	5,00	—
Extrato de malte	—	—	5,00
MgSP ₄ ·7H ₂ O	—	—	0,20
pH inicial	—	7,4	6,9 – 7,1

Quanto à temperatura, ALSOP (1983) cita um aumento de alguns graus devido ao caráter exotérmico das reações envolvidas, sendo a temperatura mais usada 25°C (HINES et al. (1953)), JEANES et al. (1948) e VELJKOVIC et al. (1988)), havendo variações pequenas.

O término do processo se dá entre 18 e 24 horas, tempo no qual se obtém um máximo de viscosidade coincidindo com um pH entre 4,5 e 4,8 (HOLLÓ & LÁSZLÓ (1971) e JEANES et al. (1948)). Esta queda do pH de valores próximos da neutralidade até 4,5 se dá pela formação de subprodutos ácidos durante o processo.

A dextrana de alto peso molecular, chamada comumente de dextrana nativa, é obtida neste tipo de processo, com conversão de 25% da sacarose inicialmente adicionada o que corresponde a aproximadamente 50% da glicose disponível (ALSOP (1983) e JEANES et al. (1948)).

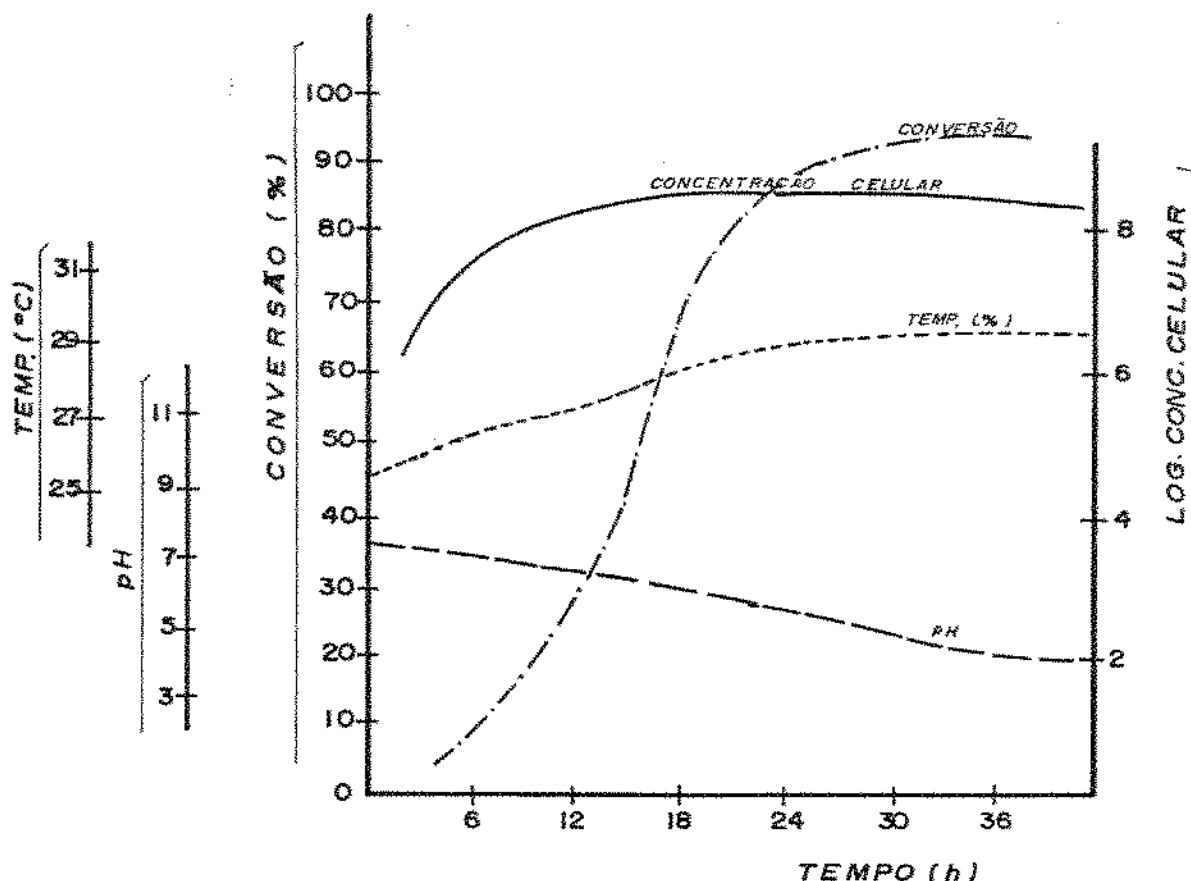


Figura 2: Variação nos parâmetros de fermentação durante processo convencional de produção de dextrana (ALSOP (1983)).

• Processo enzimático

Neste tipo de processo que vem sendo estudado desde 1941, quando HEHRE (1941) efetivou a produção de dextrana em caldos fermentados isentos de células e que ganhou impulsos com trabalhos de Koepsel et al. (1952) e Tsuchiya et al. (1952), é feita primeiramente a produção de dextrana-sacarase em condições controladas de fermentação, e depois de separadas as células, a enzima na sua forma bruta ou purificada é utilizada na produção de dextrana.

O processo enzimático apresenta várias vantagens em relação ao processo convencional:

- Simplificação do processo de purificação: no processo convencional, o caldo adquire alta viscosidade (mais de 500 cp) o que dificulta a separação das células, o que não ocorre no processo enzimático já que a produção de dextrana nativa, causadora da alta viscosidade se dá em meio já livre dos microrganismos.
- Maior rendimento: o rendimento teórico da síntese enzimática é de 100%, já que não há consumo de sacarose no crescimento microbiano. Em condições industriais, com concentrações de sacarose abaixo de 10% a produção fica pouco abaixo do valor teórico.
- Melhores condições de controle: no processo tradicional ocorrem simultaneamente três processos - crescimento celular, produção de dextrana-sacarase e síntese de dextrana - com condições de temperatura, pH e concentração de sacarose ótimas distintas. Este fato inviabiliza o controle do processo, já que as condições ótimas são transitórias e pontuais para cada processo. No processo enzimático o controle e otimização da fermentação e da síntese enzimática ficam grandemente facilitados.

Maiores detalhes das condições de processo serão descritas em itens posteriores.

Não são disponíveis valores exatos da produção mundial de dextrana, no entanto, dados de DE BELDER (1987) apontam uma demanda superior a 500 toneladas de dextrana clínica por ano.

O maior produtor de dextrana e soluções da mesma, é a Pharmacia (Uppsala - Suíça). Outros produtores de dextranas e derivados (DE BELDER (1987)) encontram-se nas Tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2: Produtores mundiais de dextranas e derivados.

Empresa	País
Fisons	Inglaterra
Meito	Japão
Pfeizer e Langen	Alemanha
VEB Serumwerke	Alemanha
Polfa	Polónia

Tabela 3: Principais produtores mundiais de dextrana clínica.

Empresa	País
Pharmacia	Estados Unidos e Suíça
Knoll/Schiwa	Alemanha
Abott	Estados Unidos
Travenal	Estados Unidos
Fisons	Inglaterra
Polfa	Polónia
Pisa	México

Não existe referência a nenhum produtor nacional de dextrana ou qualquer de seus derivados.

2.2. REDUÇÃO DE PESO MOLECULAR

A dextrana produzida tanto pelo processo convencional como pelo enzimático sem utilização de aceptores, possui peso molecular superior a 50×10^6 . Para sua utilização farmacêutica existe necessidade de redução do peso molecular de acordo com a aplicação desejada, tendo sido mais estudada a obtenção de dextrana clínica, usada como restaurador do volume sanguíneo, com peso molecular entre 40.000 e 70.000.

Embora praticamente toda dextrana clínica produzida no mundo seja obtida através de hidrólise ácida da dextrana nativa com ácidos minerais, existem vários artigos e patentes que tratam de hidrólise enzimática, alcalina e clivagem por ultrassom; além de depolimerização térmica em pH neutro.

• Hidrólise ácida

As principais vantagens da hidrólise ácida são a facilidade no controle, possibilidade de utilização da dextrana nativa úmida ou mesmo não isolada e sem exigência de equipamentos sofisticados. A hidrólise é feita normalmente utilizando ácidos sulfúrico ou clorídrico (WOLFF et al. (1954)) em temperaturas próximas a 100°C , sendo controlada pela medida da viscosidade.

WOLFF et al. (1954) estudaram a hidrólise ácida da dextrana de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 para obtenção de dextrana clínica analisando o efeito da concentração inicial de dextrana, uso de ácido clorídrico ou sulfúrico e relação tempo/temperatura na qualidade da dextrana obtida. A Figura 3 resume os resultados obtidos nesses estudos.

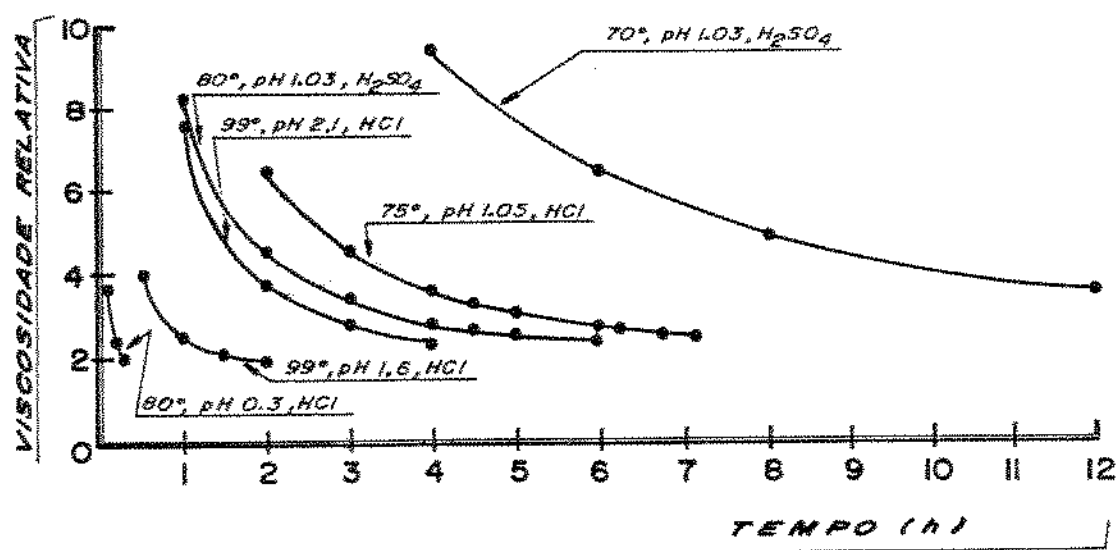


Figura 3: Variação da viscosidade relativa de hidrolisados de dextrana com o tempo, em várias condições de temperatura e acidez (WOLF et al. (1954)).

A concentração inicial da dextrana não altera significativamente o resultado da hidrólise, havendo apenas um compromisso com a agitação em função da alta viscosidade observada em altas concentrações.

Para um mesmo pH (entre 1,0 e 1,5), o ácido clorídrico mostrou-se mais eficiente que o ácido sulfúrico, além deste trazer problemas de purificação devido ao fato de haver formação de Na₂SO₄ depois da neutralização, bem menos solúvel em água que o NaCl.

O tempo e temperatura de hidrólise devem ser controlados em função da viscosidade final desejada. Em condições de pH próximos a 1,5 e temperatura entre 70 e 75°C, a obtenção de um máximo de dextrana clínica necessita de 24 a 46 horas de hidrólise.

ZIEF, BRUNNER e METZENDORF (1956) citam pH de 1,9 a 100°C por uma hora, seguida de ligeira elevação do pH para 2,2 para uma atenuação da hidrólise.

Nos trabalhos realizados na CODETEC, (CURRALERO et al. (1991)) para obtenção de dextrana para produção do complexo de ferro, portanto com peso molecular bem mais baixo, condições mais drásticas foram utilizadas.

• Hidrólise enzimática

O estudo de dextranases, enzimas capazes de degradar dextranas produzidas por diferentes linhagens de microrganismos, merece destaque pelo seu valor potencial em pesquisas básicas ou aplicadas como produção de dextrana clínica ou na prevenção de cáries por impedir ou minimizar a formação de placas bacterianas (SIDEROTAM (1974)).

TSUCHIYA et al. (1952) começaram a pesquisar a capacidade de produção de dextranases extracelulares de várias linhagens de bactérias, leveduras e fungos. Como resultado destes estudos foram detectadas linhagens de *Penicillium lilacinum*, *Penicillium funiculosus* e *Spicaria* que produziam quantidades consideráveis de dextranases extracelulares. Além do estabelecimento de condições

de cultura para produção dessas dextranases e de pH ótimo de atividade e estabilidade, TSUCHIYA et al. (1952) estudaram a atividade enzimática da dextranase de *P. funiculosus* em dextranas produzidas por diferentes linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* (entre elas a NRRL B 512), com diferentes proporções de ligação α -1,6.

Utilizando enzima de *P. funiculosus*, JEANES et al. (1953) investigaram a produção de isomaltose e isomaltotriose com rendimentos de 50 e 20%, a partir de dextrana de *L. mesenteroides* NRRL B 512.

CHARLES & FARREL (1957) apresentam condições de produção e degradação de dextrana nativa e caldos brutos contendo dextrana, por dextranase de *P. lilacinus* para obtenção de dextrana clínica.

BASEDOW (1980) estudou e comparou a cinética enzimática de dextranase de *P. funiculosus* e hidrólise ácida, concluindo que no primeiro caso há menor formação de cadeias muito pequenas.

Em contraste às dextranases produzidas por fungos do gênero *Penicillium* que produzem oligossacarídeos e pequenas quantidades de glicose, TSUCHIYA et al. (1952), usando preparações de amilase de *Aspergillus niger*, obtiveram transformação de dextrana de diferentes estruturas em glicose apenas, embora com velocidade bastante baixas. Resultados semelhantes quanto à composição do produto obtido foram apresentados por SIRY & HEHRE (1956) utilizando culturas de *Bacteroides anaeróbicos* entéricos.

NOVAK e WITT (1961) patentearam um processo de obtenção de dextrana clínica, onde são adicionados sacarose, dextrana-sacarase e enzima de *Aspergillus wentii* obtendo, com rendimentos da

ordem de 60-80% de dextranas com viscosidade intrínseca na faixa permitida pelo FDA para o uso clínico como expansor de plasma.

Mais recentemente, BASEDDW (1980) estudou e comparou a cinética enzimática de dextranase de *P. funiculosus* e hidrólise ácida, concluindo que no primeiro caso há menor formação de cadeias muito pequenas.

Embora a despolimerização enzimática pareça bastante promissora, sendo obtidos rendimentos bons e produtos bastante homogêneos, sua utilização se restringe à escala laboratorial, não tendo sido encontradas referências à produção industrial.

• Outros métodos

A despolimerização térmica da dextrana foi estudada por WOLF et al. (1953) e STACEY & PAUTARD (1952), com resultados semelhantes. Ambos os grupos obtiveram a redução do peso molecular da dextrana em temperaturas acima de 160°C, havendo no entanto alteração na coloração do produto e o surgimento de dextranas insolúveis em água depois do tratamento térmico.

Estudos estruturais da dextrana obtida por tratamento térmico mostram uma maior proporção de ligações não α -1,6 comparativamente àsquelas obtidas da hidrólise ácida.

O mecanismo da redução do peso molecular pela ação de ultrassom foi estudado por BADEDOW & EBERT (1975), mostrando que a reação é de primeira ordem sendo a taxa de degradação proporcional ao peso molecular, na faixa estudada (30.000-90.000). A quebra se dá na região mediana da cadeia, proporcionando produto bastante

homogêneo. O uso do ultrassom para a ativação da hidrólise ácida foi estudada pelos mesmos pesquisadores (1979), sendo verificado um aumento na constante da taxa de reação em comparação ao processo ácido sem ativação.

Além dos métodos de redução de peso molecular citados anteriormente, vem sendo estudada ultimamente a obtenção de dextrana de menor peso molecular durante a síntese enzimática, evitando a etapa hidrolítica, pela adição de aceptores que interferem na ação da dextrana-sacarase, produzindo pequenos polissacarídeos. Este tipo de processo será discutido mais profundamente em itens posteriores.

Seja qual for o processo utilizado para a redução do grau de polimerização, se faz necessário uma etapa de fracionamento para o isolamento da fração de interesse. Comumente este fracionamento é feito pela precipitação da dextrana com diferentes concentrações de solventes orgânicos normalmente álcoois ou cetonas solúveis em água (GRONWALL & INGELMAN (1953)) como etanol, metanol, propanol, acetona, metiletilcetona e dietilcetona. Normalmente a escolha recai sobre etanol e acetona pelo custo, baixa toxicidade, disponibilidade e facilidade de recuperação.

Em soluções contendo 5% de dextrana, a precipitação da dextrana clínica se dá com uma concentração de solvente entre 44 e 51% (ZIEF et al. (1956)), sendo feitas várias solubilizações e precipitações para garantir a homogeneidade do produto. O fluxograma de um processo convencional de produção de dextrana clínica é apresentado na Figura 4.

Outras alternativas de fracionamento são a ultrafiltração (WILKIE et al. (1957) e BAKER (1969)) e a cromatografia de filtração em gel em batelada (BARKER et al (1988) e GRANATH & FLODIN (1961)), semi contínua (BARKER & VLACHOGIANIS (1983)) e contínua (BAKER et al. (1989)). Estas técnicas vêm sendo estudadas mais recentemente e sua principal desvantagem até o momento é o alto custo dos equipamentos envolvidos, bem como vida útil curta das membranas e resinas.

2.3. PROPRIEDADES

A dextrana produzida pela linhagem NRRL B 512 apresenta apenas dois tipos de ligação: α -1,6 na cadeia principal e ramificações na posição α -1,3, sendo normalmente curtas, com poucas unidades glicosídicas.

A dextrana B-512 F é completamente solúvel em água, metil sulfóxido, formamida, etilenoglicol e glicerol (DE BELDER (1987)). Em solução aquosa (3 a 10%) apresenta rotação óptica característica em torno de $+200^\circ$, apresentando uma solução clara e bastante estável à esterilização por calor, ao congelamento e descongelamento (DE BELDER (1987)).

O peso molecular depende de condições de síntese como temperatura, concentração de sacarose e presença de outros açúcares, no entanto a dextrana nativa produzida pelo método convencional pode atingir de 9 a 50×10^6 , tendo uma composição molecular bastante dispersa (DE BELDER (1987) e FOSTER (1968)).

As propriedades reológicas da dextrana foram bastante estudadas, devido às suas aplicações industriais e por serem de

grande importância no controle dos processos produtivos, na determinação do peso molecular médio.

WALE, MARSHALL & WEISSBERG (1953) propuseram uma correlação entre peso molecular médio e viscosidade intrínseca para dextrana com PM entre 20.000 e 250.000, dada por:

$$[\eta] = 10^{-3} \text{ PM}^{1/2}$$

GRANATH, segundo BELDER (1987), obteve correlação semelhante para dextranas clínicas ($\text{PM} < 5 \times 10^5$):

$$[\eta] = 2,23 \times 10^{-3} \text{ PM}^{0,43}$$

O comportamento da viscosidade das soluções de dextrana é bastante característico devido à grande flexibilidade da cadeia principal e à ausência de interações entre as moléculas. Uma solução de dextrana com concentrações até 5% (p/v) apresenta comportamento Newtoniano (JEANES (1953)), como pode ser constatado na Figura 5.

O efeito da temperatura nas propriedades reológicas da dextrana nativa foi estudado por SABATIE et al. (1986), sendo verificados diferentes comportamentos, denotando diferentes estruturas moleculares.

A reatividade da molécula de dextrana frente a alguns ácidos fortes, para formação de ésteres é uma propriedade importante na obtenção de derivados de uso clínico (FOSTER (1968)), assim como sua capacidade de complexar íons metálicos.

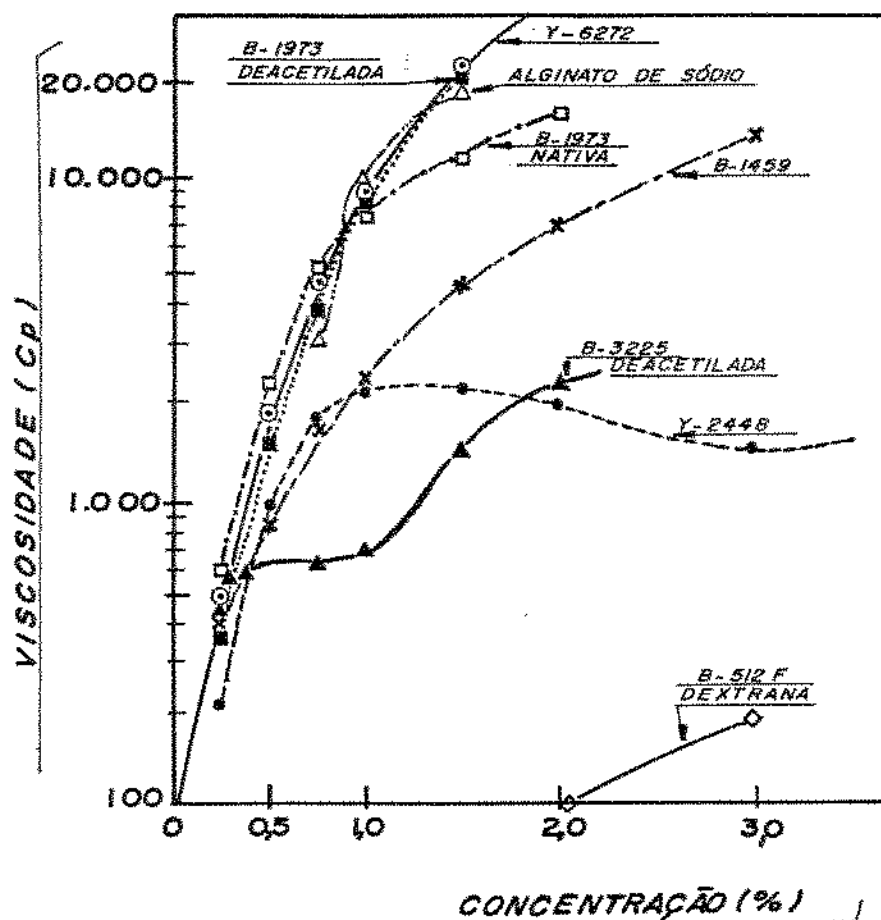


Figura 5: Comportamento reológico de soluções de dextranas (JEANES (1974))

2.4. USOS

Até meados da década de 40 os polissacarídeos utilizados comercialmente eram basicamente de origem vegetal, tanto para uso alimentício como estabilizantes, emulsificantes, flocculantes ou espessantes como para uso clínico e farmacêutico. A partir de 1945 graças às investigações de laboratórios americanos (HINES et al. (1953)), o uso de polissacarídeos microbianos vem crescendo, principalmente na utilização clínica, como expensor de plasma sanguíneo.

Muitas dextranas têm sido estudadas e propostas para uso industrial, sendo citadas por NEELY (1960) várias patentes registradas para dextranas e derivados. Apesar do grande potencial comercial desses produtos, poucos usos foram realmente desenvolvidos. Nenhum outro grupo de polissacarídeos foi tão extensivamente estudado com tão poucas aplicações em uso. Isto se deve ao fato de que os vários polissacarídeos conhecidos apresentam propriedades semelhantes, podendo ser substituídos. O custo de produção tem papel determinante nos casos onde o produto é desejável em função de propriedades também encontradas em outros polissacarídeos.

As Tabelas 4 e 5 apresentam algumas aplicações da dextrana e seus derivados.

Tabela 4: Aplicações da dextrana (segundo QUEIROZ (1987))

Aplicação	Função
I. Indústria Farmacêutica • Crioprotetor • Raio X • Comprimidos • Cosméticos • Expansão do plasma	• Diminui os danos causados pelo con<u>g</u>elamento em materiais biológicos • Agente de suspensão • Agente ligante e de solubilização • Emulsificante e estabilizante • Expansão temporária do volume san<u>g</u>üíneo
II. Indústria de Alimentos • Doces e xaropes • Geléias e chicletes • Sorvetes • Composição de cobertu<u>r</u>a • Pudins	• Inibe a cristalização, promove a homogeneização e espessamento • Agente gelificante • Inibe a formação de cristais e man<u>t</u>ém o volume • Agente estabilizante • Espessante
III. Extração de petróleo • Lama de perfuração • Fluidos de extração	• Colóide de proteção e lubrificação • Evita perda de água
IV. Outros • Produção de alumínio • Produção de pó metá<u>l</u>ico • Produção de soda cáus<u>t</u>ica • Produção de combustí<u>v</u>el nuclear	• Agende de sedimentação • Evita o crescimento de cristais, formando gel precipitante • Precipitação de impurezas através de complexos • Agente complexante

Tabela 5: Aplicações dos derivados de dextrana (segundo QUEIROZ (1987))

Derivado	Aplicação
• Triacetato	• Composição de filmes para embalagens
• Palmitatos e Esteratos	• Impermeabilizante, regeneração de celulose
• Sulfato	• Ligantes em placas metálicas e polietileno
• Fosfato	• Ação anticoagulante e anti-viral
	• Gomas de alta viscosidade
• Nitrato ou nitrato-sulfato	• Inibição de atividade peptídica
• Hidroalquil derivado	• Explosivos e propelentes géis
• Carboximetil	• Expansor de plasma com melhores condições de estocagem
	• Ligante em medicamentos (comprimidos)
	• Espessamento em xaropes, estabilizante em sorvetes
	• Carreador de princípios ativos-antibióticos, pesticidas
	• Emulsificante de tintas
	• Filmes para embalagem biodegradável
	• Gel aquoso e organogéis
	• Estabilizante de sucos
• Dialdeído	• Prolonga a ação de drogas como novocaína e tubazina
• Iodo-Dextrana	• Tratamento de bócio - não tóxico e não alérgico
• Ferro-Dextrana	• Tratamento e profilaxia de anemia carencial

Destacaremos a seguir algumas utilizações de dextrana, com maior importância comercial. Devido às suas propriedades peculiares, estes produtos vêm sendo usados com sucesso, já que substitutos adequados ainda não surgiram no mercado.

- Indústria farmacêutica

As dextranas de baixo peso molecular apresentam duas importantes características, que as qualificam para os usos clínicos: são completamente metabolizadas no organismo e não apresentam efeitos tóxicos ou alérgicos. Dentre os usos clínicos, destacam-se:

- (a) Expansor de plasma sanguíneo:

São disponíveis no mercado dois expansores de plasma, com aplicações e propriedades bastante semelhantes, à base de dextrana 40 (peso molecular médio em torno de 40.000) e dextrana 70 (peso molecular médio de 70.000) (FOSTER (1968) e MARTINDALE (1982)).

A dextrana 40 (solução 10% p/v) produz uma expansão no volume sanguíneo mais breve que a dextrana 70 (solução 6% p/v). Esta, por apresentar propriedades osmóticas muito semelhantes às do plasma é mais utilizada para manter o volume sanguíneo e a pressão arterial em casos de choque por queimaduras ou hemorragias severas (MARTINDALE (1982)).

- (b) Dextrana-sulfato

A dextrana sulfato vem sendo usada com sucesso como agente anti-coagulante, com propriedades semelhantes à heparina (FOSTER (1968)). Mais recentemente têm sido investigadas suas

propriedades anti-virais, inclusive contra o vírus HIV (BUSSO & RESNICK (1990)).

(c) Ferro-dextrana

Vários foram os carboidratos testados para produzir soluções de ferro estáveis e mais facilmente assimiláveis, para infusão intramuscular ou intravenosa. Os objetivos foram plenamente alcançados com a ferro-dextrana, onde as moléculas do polissacarídeo têm baixo peso molecular (5.000 + 2.500).

Tem sido muito usada no tratamento e profilaxia de anemia carencial em animais e humanos.

• Indústria química

Na indústria química, a dextrana é muito usada para produção de redes moleculares, usadas como enchimento de colunas cromatográficas (QUEIROZ (1987)). Os produtos mais conhecidos são SEPHADEX e DEAE-DEXTRANA, obtida da formação de ligações cruzadas entre dextrana e radicais dietilaminoetil (DEAE).

3. DEXTRANA-SACARASE

3.1. PRODUÇÃO

• Microrganismo

Os principais produtores de dextrana-sacarase são bactérias esféricas e imóveis do gênero *Leuconostoc*, espécies *mesenteroides* e *dextranicum* (ALSOP (1983) e AQUARONE (1975)). Estas bactérias têm grandes carências nutricionais, exigindo meios bastante ricos em vitaminas e aminoácidos para seu desenvolvimento

(TSUCHIYA (1960)). São essenciais para o crescimento, a valina e o ácido glutâmico (QUEIROZ (1988)), além de tiamina, ácido pantotênico e nicotínico (ALSOP (1983)).

A dextrana-sacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512-F é uma enzima indutiva, sendo a sacarose o único substrato indutor conhecido (PAUL et al. (1985) e SIDEBOTHAM (1974)). O microrganismo tem um bom crescimento com outras fontes de carbono, que não sacarose, no entanto não há formação da enzima.

• Condições de produção

TSUCHIYA et al. (1952) estudaram vários fatores que influenciam na produção de dextrana-sacarase. Utilizando concentração de sacarose no meio variando de 0,5 a 5,0%, foi verificado havendo um aumento na produção de 6 para 120 UDS/ml. Para a concentração acima de 2%, foram constatadas grandes concentrações de dextrana, sendo a concentração de 2% considerada ótima para produção de dextrana-sacarase, sendo atingidas 86 UDS/ml de atividade.

As concentrações de fosfato, na forma de KH_2PO_4 e nitrogênio, como água de maceração de milho foram estudadas, sendo percebida estreita relação entre estes nutrientes. Há aumento na produção apenas quando a concentração de ambos é aumentada. Foi verificado que a adição de solução de sais contendo $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,27%), NaCl (0,01%), FeSO_4 (0,01%) e MnSO_4 (0,01%) além de fosfato e nitrogênio, tinha efeito positivo na produção.

A relação entre pH e produção ficou evidenciada, havendo maior acúmulo de enzima em pH de 6,7, embora com maior tempo de cultivo e menor estabilidade da enzima. O pH foi mantido nos pHs preestabelecidos pela adição de soluções de NaOH ou KOH. Os autores não recomendam o uso de NH₄OH, para o acerto de pH, já que foi constatada diminuição na produção quando de sua utilização. Temperaturas superiores a 20°C foram consideradas prejudiciais à produção, pois há diminuições na estabilidade da enzima.

HEHRE (1956) estudou a variação da concentração de sacarose e de fosfato de potássio entre 2 e 3% no meio proposto por TSUCHIYA, obtendo atividades entre 90 e 120 UDS/ml com 24 horas de fermentação a 25°C. Como fonte de nitrogênio foi usado extrato de levedura ou água de maceração de milho a 0,5%.

Segundo OLMO (1972), a concentração de nitrogênio orgânico no meio deve estar entre 0,045 e 0,06% para assegurar uma boa atividade enzimática. Valores superiores a 0,06% não compensam economicamente o aumento da produção.

ROBYT & WALSETH (1979) observaram que a adição de cloreto de cálcio a 0,001-0,1% no meio usado por TSUCHIYA, dobrou a produção de enzima. Concentração de cálcio acima de 0,1% afeta negativamente o crescimento microbiano, diminuindo a atividade.

O efeito dos íons Ca⁺⁺ na estabilidade da dextrana-sacarase foi confirmado por LAWFORD et al. (1979), observando desnaturação irreversível por incubação prolongada na ausência de cálcio.

A utilização de melaço como fonte alternativa de carbono foi estudada por QUEIROZ (1987) e QUEIROZ & MAUGERI (1989), sendo

obtidas 35 UDS/ml em meio contendo água de milho (10 g/l), melaço a 80 Brix, fosfato de potássio e sais.

O *Leuconostoc mesenteroides* é uma bactéria aeróbica facultativa, desenvolvendo-se bem em anaerobiose. KOEPSELL & TSUCHIYA (1952) notaram que a produção enzimática é mais elevada em culturas agitadas do que em estáticas. Um estudo do efeito da injeção de ar, oxigênio puro e dióxido de carbono foi feito por ALSOP (1983), concluindo que o crescimento microbiano é prejudicado tanto pela presença de dióxido de carbono como de oxigênio puro, havendo um aumento no crescimento com aeração leve ou em anaerobiose.

LANDON & WEBB (1990) fizeram o "scale up" de um processo fermentativo anaeróbico para produção de dextrana-sacarase, obtendo em escala de laboratório de solução com atividade de 142 UDS/ml. Na transposição de escala com um fermentador de 1 m³ sem agitação no entanto, a atividade máxima alcançada foi bastante baixa, chegando a apenas 45 UDS/ml.

Desde os trabalhos de KOEPSELL (1952) e TSUCHIYA (1953) até o final da década de 70, os processos de produção de dextrana-sacarase eram descontínuos, ficando a produção máxima em torno de 50-70 UDS/ml.

No início da década de 80, segundo ALSOP (1983), LOPEZ & MONSAN conseguiram aumentar consideravelmente os rendimentos até então obtidos pela adição contínua de sacarose, principalmente durante a fase logarítmica de crescimento, quando a formação da enzima é induzida, sendo obtidos rendimentos de 180 UDS/ml.

Usando basicamente o meio proposto por TSUCHIYA et al. (1952), com controle de pH em 6,7 e adição de sacarose em quantidades crescentes, SCHNEIDER et al. (1982) obtiveram até 300 UDS/ml em escala piloto.

QUEIROZ & MAUGERI (1989) estudaram vários tipos de alimentação de sacarose em meio padrão (LOPES (1979)) e em meio alternativo contendo melaço e água de maceração de milho. Com alimentação exponencial, controlada pelo sistema de pH, foram obtidas entre 50 e 70 UDS/ml, enquanto que com alimentação linear de 16-18 g/h de açúcar, houve um aumento no valor máximo de atividade, com diminuição na produtividade no caso do meio padrão e um aumento no meio alternativo.

BROWN & McAVOY (1990) testaram a adição de solução alcalina de sacarose associada ao sistema de controle de pH, sendo alcançados resultados bastante satisfatórios (300 UDS/ml) e trazendo maior simplicidade operacional ao processo.

A produção de dextrana-sacarase por fermentação contínua tem sido pouco estudada, com poucas referências sobre o assunto (ALSOP (1983)).

LAWFORD et al. (1979) não conseguiram resultados satisfatórios com este tipo de processo, atingindo um máximo de 9 UDS/ml com taxa de diluição de 0,53/h. Apesar das conclusões pessimistas neste trabalho, PAUL et al. (1985) conseguiram uma produtividade 3 vezes maior que aquela conseguida com batelada alimentada, chegando a 70 UDS/ml, com taxa de diluição de 0,4/h.

3.2. PROPRIEDADES

Dextrana-sacarase [EC 2.4.1.5, α (1 $\rightarrow$ 6) D-glucana: D-frutose 2-glicosil transferase] é uma das poucas enzimas que não necessitam da presença de cofatores ou intermediários fosforilados de alta energia para a síntese de polissacarídeos. A energia requerida para a condensação de duas porções glicosídicas é fornecida pela hidrólise da sacarose.

Durante alguns anos, a sacarose era o único substrato conhecido, levando alguns pesquisadores (EBERT & SCHENK (1968), HEHRE (1955) e HEHRE (1968)) a afirmar que a dextrana-sacarase era absolutamente específica. Em trabalhos posteriores de JUNG & MAYER (1981) e GRIER & MAYER (1981), deu-se a confirmação de que α -1-fluoroglicose também é um bom substrato para a dextrana-sacarase, com valores de K_m e V_{max} comparáveis ao da sacarose. Outros fluoro-açúcares foram testados (GRIER & MAYER (1981)), mostrando efeito inibitório. KABOLI & REILLY (1980) citam ainda a lactulosacarose como substrato para a enzima.

KABOLI & REILLY (1980) mediram a energia de ativação da dextrana-sacarase na forma livre e imobilizada, chegando a 8,6 e 1,7 kcal/mol respectivamente, citando ainda outros valores bastante diferentes para a enzima livre, de 5 a 10 kcal/mol.

Quanto à estrutura química e peso molecular da enzima existe ainda muita controvérsia. ROBYT & WALSETH (1979), em estudos com enzima purificada, sugeriram que a dextrana-sacarase é uma glicoproteína, já que ela perdeu toda atividade em tratamentos com

concavalina A. Através de testes de hidrólise ácida os autores mostraram que a manose era o principal carboidrato presente.

MILLER et al. (1986) colocaram em dúvida a estrutura de glicoproteína, pelos baixos teores de carboidratos obtidos em suas preparações.

Devido à dextrana associada à enzima, é difícil a determinação e comparação dos valores de peso molecular citados na literatura (EBERT & SCHENK (1968), KOBAYASHI & MATSUDO (1977) e MILLER et al. (1986)), já que diferentes métodos de purificação foram utilizados.

A síntese da dextrana se dá numa ampla faixa de temperatura, de 3° a 37°C (EBERT & SCHENK (1968)), sendo que a atividade máxima da enzima se dá em torno de 30°C, tanto na forma livre como imobilizada (HEHRE (1955) e KABOLI & REILLY (1980)).

KABOLI & REILLY (1980) não observaram mudança no valor do pH de atividade máxima para a enzima livre ou imobilizada, situando o pH ótimo em 5,2. Outros autores, no entanto, citam valores diferentes para a enzima imobilizada (KABAYASHI & MATSUDA (1980) e MILLER et al. (1986)).

A sensibilidade da dextrana-sacarase ao pH é bastante grande, sendo mais estável entre 5,0 e 6,0. KOBAYASHI & MATSUDA (1980) verificaram que a enzima imobilizada apresenta uma faixa de estabilidade em pH de 6 a 9.

A temperatura também é um fator fundamental na estabilidade da enzima, havendo retenção da atividade por vários anos

quando estocada a temperaturas abaixo de 5°C (HEHRE (1955)). ROBYT & WALSETH (1979) constataram que a enzima purificada perde atividade rapidamente a 4°C, e a -15°C 60% da atividade é perdida em 20 dias. Segundo os mesmos autores, acima da temperatura ótima a queda de atividade é mais drástica para enzima livre que para a imobilizada.

Na tentativa de aumentar a estabilidade da enzima, alguns estabilizantes foram testados. Além da dextrana (KOBAYASHI & MATSUDA (1980) e ROBYT & WALSETH (1978)), outros polímeros não iônicos testados para estabilização como metilcelulose e polietilenoglicol mostraram-se efetivos. No caso da dextrana e do PEG em concentrações acima de 0,5%, foi verificada uma relação entre o efeito de estabilização e o peso molecular (MILLER & ROBYT (1984)).

Além dos polímeros aniônicos, MILLER e ROBYT (1984) estudaram o efeito de detergentes não iônicos ou fracamente iônicos, conseguindo completa estabilização da enzima. Alguns compostos como flúor, cianeto, azidas, piridina e anilina que normalmente envenenam preparações enzimáticas, não apresentam efeito detectável sobre a dextrana-sacarase (HEHRE (1955)).

ROBYT & WALSETH (1979) confirmaram o efeito inibitório do EDTA em preparações purificadas de dextrana-sacarase e a restauração da atividade com adição de íons cálcio. Os autores estudaram ainda o efeito de íons metálicos sobre dextrana-sacarase purificada e tratada com EDTA, estando os resultados obtidos resumidos na Tabela 6.

Tabela 6: Efeito de ions metálicos divalentes sobre dextrana-sacarase purificada e tratada com EDTA (5 mM) (ROBYT & WALSETH (1979))

Ion Adicionado (5 mM)	A Atividade Relativa (%)	B Atividade Relativa (%)
Ca	99	79
Mg	40	74
Mn	40	74
Sr	68	56
Ba	65	78
Zn	00	17
Co	00	65
Ni	00	69
Cd	00	39
Fe	00	30
Hg	00	00
Cu	00	00
Pb	00	00
Controle	56	78

A - Os ions foram adicionados após tratamento com EDTA (5 mM)

B - A enzima foi tratada com EDTA (5 mM), e depois retirado por diálise. A porcentagem de atividade foi calculada como 100% a atividade da enzima que não sofreu tratamento com EDTA.

A cinética da enzima dextrana-sacarase é geralmente descrita pelo modelo de Michaelis-Menten, aplicável para níveis de sacarose abaixo de 10-15%, quando a saturação da enzima é alcançada (ALSOP (1983)).

A concentração de sacarose influencia bastante a velocidade da reação, sendo que a velocidade máxima é atingida em baixas concentrações, próximas a 200 mM, ocorrendo acima desse valor, inibição pelo substrato (EBERT & SCHENK (1968) e NEELY (1958)), como mostra a Figura 6.

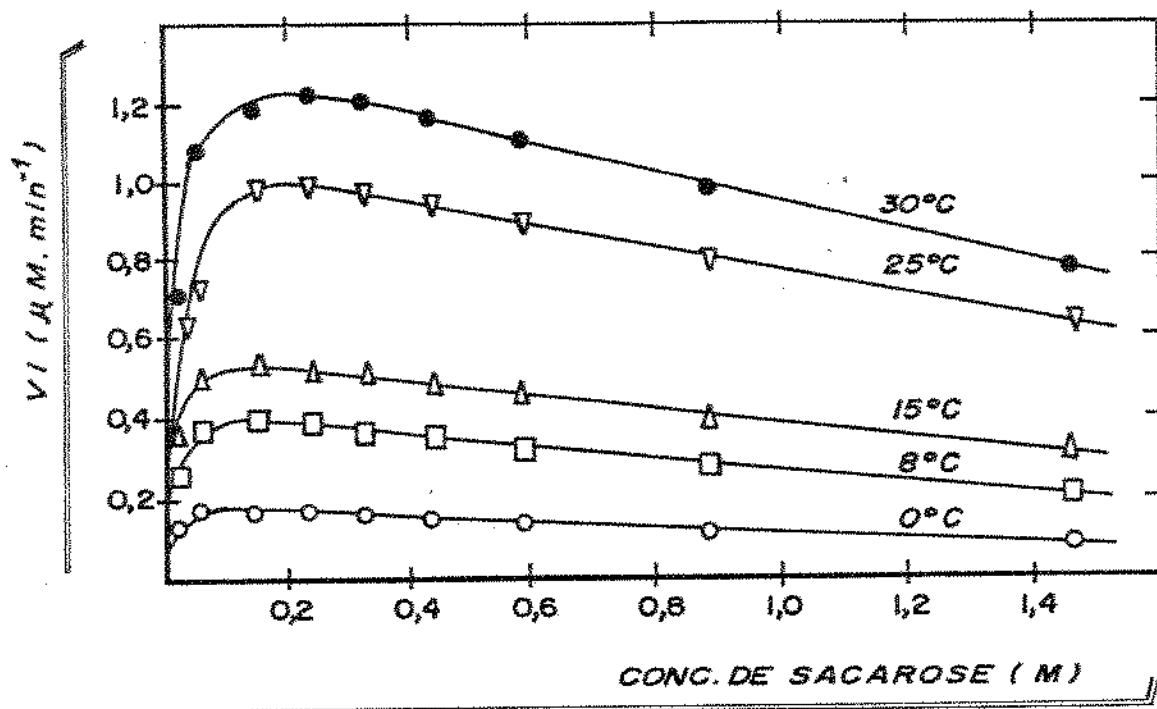


Figura 6: Velocidade inicial da reação de síntese de dextrana versus concentração de substrato em diferentes temperaturas (EBERT & SCHENK (1968))

MARTINEZ-ESPINDOLA & LOPES-MUNGUÍA (1985) mediram a velocidade inicial em ampla faixa de concentração de sacarose e verificaram que o modelo de inibição pelo substrato se adequa bem aos dados cinéticos obtidos. Foram assim calculados valores de K_m (5,12 g/l) e K_i (4321 g/l).

Valores diferentes de K_m foram obtidos por NEELY (1958) (11,97 g/l) e por PAUL et al. (1986) e TSUCHIYA (1960) (4,1 g/l).

Com o estudo de reações enzimáticas para produção de dextrana com peso molecular controlado usando aceptores foi notado o aumento de K_m e V_{max} na presença desses açúcares.

TSUCHIYA (1960), estudando a reação de formação de dextrana na presença de sacarose e α -metil glicosídeo em várias concentrações, notou que o fenômeno de inibição pela sacarose fica diminuído à medida que a concentração de acceptor aumenta e que a concentração ótima de sacarose aumenta com o aumento da concentração de α -metil glicosídeo, confirmando dados do trabalho anterior de STRINGER & TSUCHIYA (1958).

Mais recentemente PAUL et al. (1986) estudaram o comportamento cinético da enzima na presença de maltose, observando que com o aumento da concentração de maltose de 0 a 200 g/l, os valores da constante aparente de Michaelis variou linearmente de 12 a 163 mM com a velocidade máxima aumentando mais de três vezes.

O efeito da pressão na reação enzimática de formação da dextrana foi estudada por GREULICH & LUDWIG (1977), numa faixa de 1 a 1000 bar. Em aproximadamente 600 bar, se torna aparente a desnaturação irreversível da enzima, sendo esta desnaturação uma reação de primeira ordem. Quando a pressão é aplicada, a velocidade da reação sofre uma redução em baixas concentrações de sacarose e um aumento em altas concentrações.

3.3. MECANISMOS DE AÇÃO CATALÍTICA

Duas hipóteses foram levantadas com relação ao crescimento da cadeia de dextrana. Segundo a hipótese da propagação por múltiplas cadeias, a adição de cada unidade de glicose ocorreria separada e aleatoriamente, havendo dissociação entre a enzima e a cadeia em crescimento a cada ciclo, sendo cada cadeia constituída por várias moléculas de enzima. Neste caso, oligossacarídeos e dextranas de baixo peso molecular deveriam ser detectáveis durante a síntese, no entanto os autores envolvidos neste estudo foram incapazes de encontrar estes produtos, confirmando a hipótese da propagação por cadeia única. Neste mecanismo, uma única molécula de enzima construiria uma cadeia inteira de dextrana. Isto implica que o produto tem alto peso molecular mesmo no início da reação.

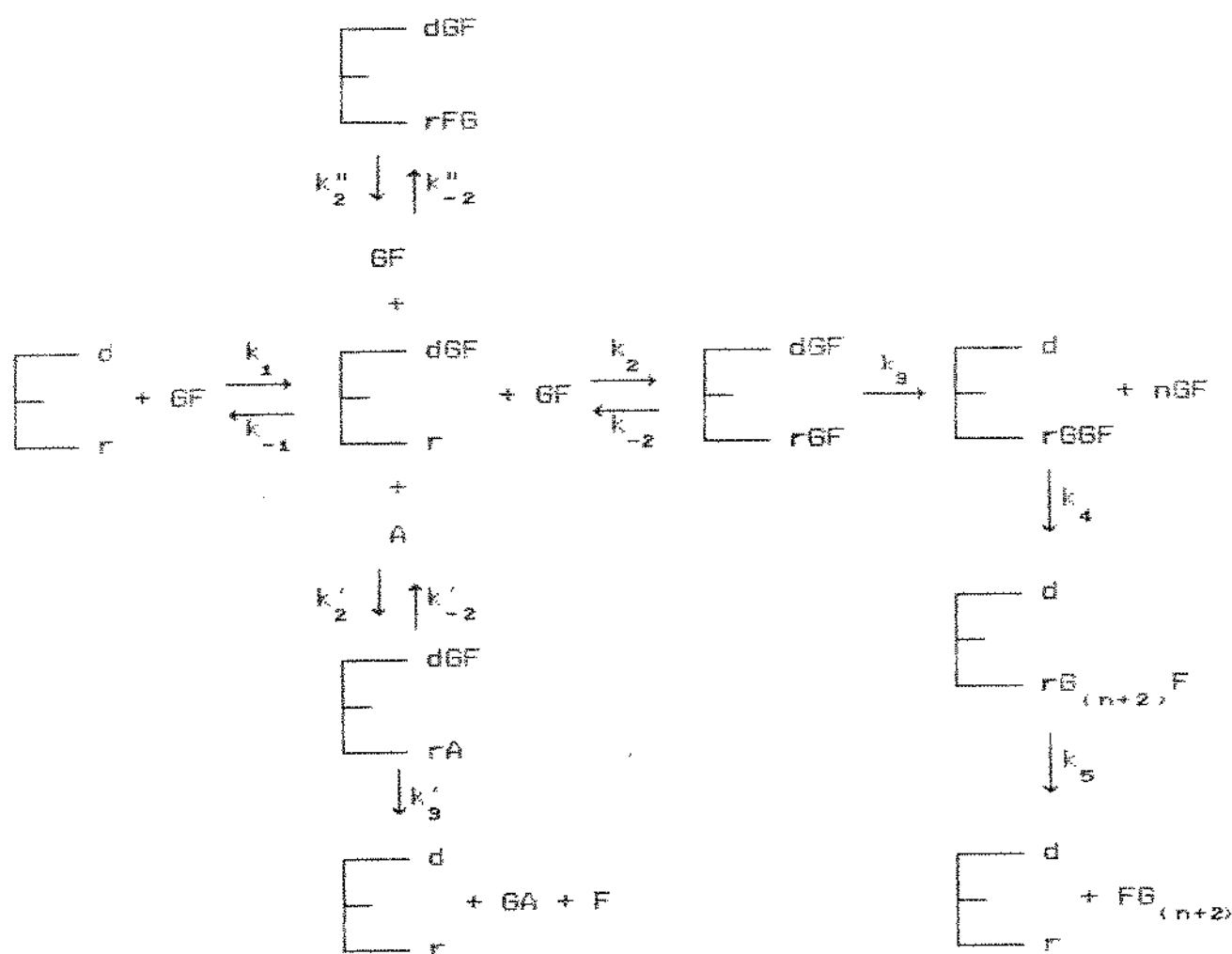
BOVEY (1959) observou um aumento no peso molecular do produto (de 20×10^6 para 50×10^6), e justificou este aumento pelo aparecimento de ramificações, sugerindo a existência de uma enzima ramificante mais estável ao calor, embora como outros pesquisadores não tenha conseguido o seu isolamento.

Segundo um trabalho de revisão de NEELY (1960), BOVEY sugeriu que a enzima responsável pela polimerização, faria a transferência de um resíduo glicosídico a um carbono (C3) da cadeia principal, sendo a enzima ramificante responsável pelo crescimento dessa cadeia lateral.

De acordo com o mesmo artigo (NEELY (1960)), na reação enzimática na presença de aceptores, a cadeia se propagaria pela formação de várias pequenas cadeias. O acceptor adicionado reduz a

concentração do polímero de alto peso molecular sem afetar seu peso molecular. Na ausência do acceptor a polimerização é iniciada de forma ineficiente pelas moléculas de sacarose, havendo a seguir uma propagação rápida da cadeia. Como a enzima permanece ligada à cadeia em crescimento, a energia de ativação necessária para as transferências não é perdida depois de cada uma. A propagação termina com a dissociação entre cadeia e enzima. Por outro lado, na presença dos aceptores, estes iniciam a formação da cadeia mais eficientemente, dando-se a propagação de forma mais lenta com aumento gradual do peso molecular.

Este mecanismo proposto por NELLY (1960), é ilustrado na Figura 7, representando a enzima com dois sítios ativos, um doador (d) e um receptor (r).



r = sítio receptor da enzima
 d = sítio doador da enzima
 $G-F$ = sacarose
 A = aceptor alternativo
 G = glicose
 F = frutose

Figura 7: Esquema do mecanismo da reação de síntese da dextrana proposto por NEELY (1960)

Neste mecanismo há a representação da inibição pelo substrato, contralada por k_2'' , que ocorreria pela absorção de um grupo frutossil da sacarose no sítio ativo receptor, ao invés do grupo

glicosil (etapa k_2), que ocorre normalmente. A etapa k_3 seria a iniciação da cadeia, k_4 a propagação (rápida) e k_5 a terminação por dissociação ou inativação do complexo enzima-dextranosil. O mecanismo na presença de aceptores é representado pela etapa k'_2 onde $k'_2 > k_2$ (a absorção do acceptor é mais eficiente que da sacarose) e k'_9 controla a formação de pequenas cadeias devido à presença do acceptor. NEELY não explica com este mecanismo a formação das ramificações e sugere que a cadeia principal é formada a partir da ponta não redutora.

HEHRE (1968), estudando a ação da amilosacarase, observou que na transferência dos resíduos D-glicosílicos, o crescimento da cadeia se dá pelo final não redutor e sugeriu que a ação da dextrana-sacarase era semelhante.

EBERT & SCHENK (1968) descreveram um mecanismo bastante semelhante ao de NEELY (1960), propondo no entanto a transferência dos grupos glicosílicos no final redutor, argumentando que a terminação da cadeia se dá pela quebra da ligação entre a enzima e a cadeia em crescimento. A quebra é devido à ação do acceptor, que desfaz o complexo enzima-cadeia, impedindo que a ligação se refaça. A competição do acceptor com o substrato explica a formação de dextrana de baixo peso molecular.

SIDEBOTHAM (1974) considera, em um trabalho de revisão, que não existiam evidências experimentais suficientes que comprovassem a direção do crescimento das cadeias de dextranas pela dextrana-sacarase.

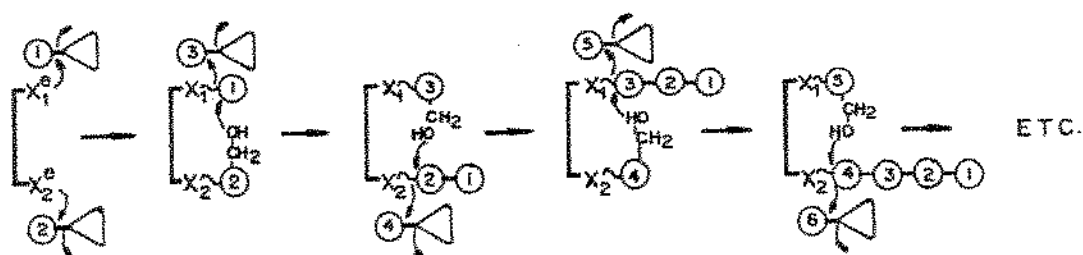
TSUMURAYA et al. (1976), estudando a síntese da dextrana de alto grau de ramificação, produzida por dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* IAM 1046, consideraram que a presença de ions metálicos, principalmente Ca^{++} , tem importância fundamental na formação das ramificações.

Uma série de estudos realizados por ROBYT et al. (1974-1982) elucidaram o mecanismo da atuação da dextrana-sacarase para formação da cadeia principal e das ramificações presentes na dextrana, na presença ou não de aceptores.

ROBYT et al. (1974), utilizando técnicas de marcadores radioativos e cromatografia, demonstraram que a dextrana encontra-se fortemente associada à enzima, provavelmente por uma ligação covalente. Através de experimentos onde a enzima foi tratada com [^{14}C] sacarose e posteriormente com sacarose não radioativa, ficou demonstrado que a dextrana é biossintetizada a partir do final redutor.

Tendo em vista estas conclusões, os autores sugeriram um mecanismo segundo o qual a enzima teria dois grupos catalíticos equivalentes, como esquematizado na Figura 8. Os dois sítios catalíticos atacam a sacarose formando complexos glicosílicos, ocorrendo então o ataque nucleofílico do $Ca-OH$ de um grupo sobre o C_1 do outro grupo glicosílico, formando uma ligação glicosídica $\alpha-1,6$. Este ataque libera um dos sítios que então ataca outra molécula de sacarose formando um novo complexo enzima-glicosila. O processo continua com os dois grupos catalíticos se alternando na formação

de complexos com o residuo glicosilico e com a cadeia em crescimento.



X_1 E X_2 $\equiv$ GRUPOS NUCLEÓFILOS NO SÍTIO ATIVO

$\bigcirc$ $\equiv$ GLICOSE

$\triangle$ $\equiv$ FRUTOSE

$\bigcirc-\triangle$ $\equiv$ SACAROSE

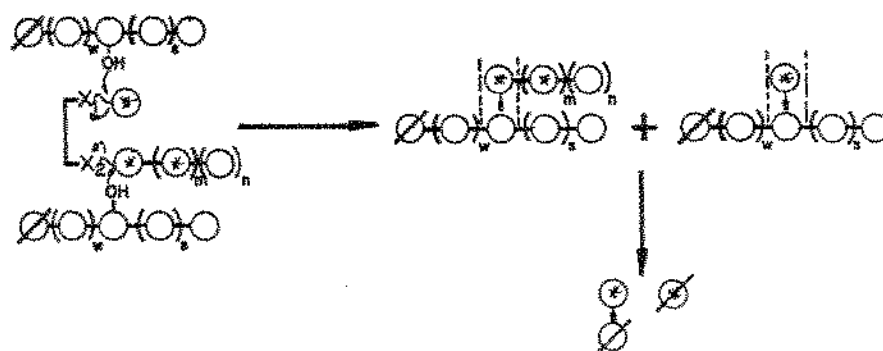
$\bigcirc-\bigcirc$ $\equiv$ GLICOSES LIGADAS POR LIGAÇÃO $\alpha-1,6$

Figura 8: Esquema do mecanismo da reação de síntese da dextrana proposto por ROBYT et al. (1974)

Na presença de sacarose, a terminação da cadeia se dá pelo descolamento da dextrana pela ação de aceptores como glicose ou frutose, quando estes atingem uma concentração suficiente para agir no sítio ativo, de tal forma que uma de suas hidroxilas faz um ataque nucleofílico ao C_1 da dextrana.

Em trabalho posterior usando os mesmos métodos, ROBYT & TANIGUCHI (1976) propuseram um mecanismo apresentado esquematicamente na Figura 9, segundo o qual a biossíntese das ligações $\alpha-1,3$, se dá quando um grupo C_3-OH de uma molécula livre de dextrana atua como um nucleófilo no C_1 no final redutor do complexo dextranosil-enzima. A partir deste ataque nucleófilo, a dextrana

se desprende do complexo, formando uma ligação α -1,3, característica das ramificações na dextrana de *L. mesenteroides* B-512. Esta sequência também pode se dar no complexo glicosil-enzima, podendo assim ser produzidas ramificações com uma única unidade de glicose ou mais.



X_1 E X_2 = GRUPOS NUCLEÓFILOS NO SÍTIO ATIVO
 $\bigcirc$ = GLICOSE
 $\bigcirc$ = UNIDADE DE GLICOSE REDUTORA
 --- = LIGAÇÃO α -1,6
 $\downarrow$ = LIGAÇÃO α -1,3

Figura 9: Mecanismo proposto por ROBYT & TANIGUCHI (1976) para formação das ramificações

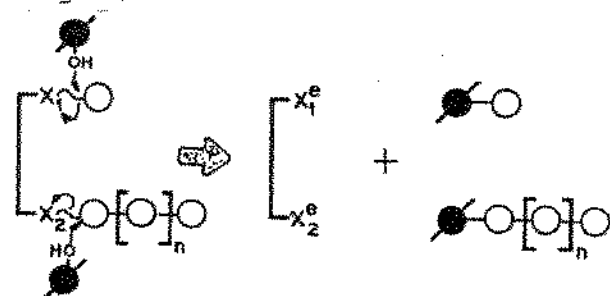
ROBYT & CORRIGAN (1977) estudaram a influência da presença de dextrana exógena na ação da enzima dextrana-sacarase de *Streptococcus mutans* DMZ 176, concluindo que a dextrana introduzida não funciona como iniciador, como sugerido por GERMAINE et al. (segundo ROBYT & CORRIGAN), mas como um ativador da enzima, por atacar o complexo dextranosil-enzima, liberando a enzima que pode assim reagir mais rapidamente com a sacarose.

ROBYT & WALSETH (1978), dando continuidade aos estudos

do mecanismo de ação da dextrana-sacarase com açúcares marcados e cromatografia, propuseram um mecanismo de ação dos aceptores, ilustrado pela Figura 10.

A enzima previamente incubada com [14 C] sacarose foi colocada em contato com glicose, frutose e maltose marcados, na presença ou não de sacarose.

Na ausência de sacarose, os três aceptores deram origem à dextrana de alto peso molecular e um oligossacarídeo de baixo peso molecular. Na presença de sacarose, uma série de oligossacarídeos homólogos foi produzida pela glicose e pela maltose, havendo evidências de que na presença da maltose forma-se primeiro um trissacarídeo, a seguir um tetrassacarídeo derivado deste e assim por diante. Com a frutose, mesmo na presença de sacarose apenas um dissacarídeo, identificado como leucrose é formado, levando a crer que este é um acceptor bastante fraco, não dando origem a uma série homóloga de oligossacarídeos.



X_1 E X_2 = GRUPOS NUCLEÓFILOS NO SÍTIO ATIVO

○ — ○ = GLICOSES UNIDAS POR LIGAÇÃO α -1,6

● = ACCEPTOR MARCADO

Figura 10: Mecanismo da atuação dos aceptores proposto por ROBYT & WALSETH (1978)

Levando em conta estas observações e os resultados de trabalhos anteriores, os pesquisadores concluíram que o acceptor atua na terminação da cadeia de dextrana e, conseqüentemente, liberando o sítio ativo para o início de uma nova.

ROBYT & EKLUND (1982) analisaram a estereoquímica envolvida nas reações da dextrana-sacarase com sacarose e aceptores através de modelos, chegando à conclusão de que os mecanismos propostos por ROBYT et al. são possíveis do ponto de vista espacial.

Algumas críticas aos trabalhos de ROBYT e sua equipe foram feitas por PARNAIK et al. (1983) e LUZIO et al (1983), principalmente no que se referia à pureza e à atividade da enzima utilizada. Estudos realizados por estes pesquisadores com enzima imobilizada em hidroxapatite não encontraram evidências que pudessem derrubar as suposições de ROBYT et al., as quais foram mais uma vez comprovadas por DITSON & MAYER (1984).

3.4. FATORES QUE AFETAM O PESO MOLECULAR DA DEXTRANA OBTIDA ATRAVÉS DA SÍNTESE ENZIMÁTICA

Desde que HEHRE (1941) evidenciou a produção de dextrana em extratos de cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* livres de células, uma série de artigos foram publicados estudando os fatores que afetam as propriedades, da dextrana formada, assim como o comportamento cinético da reação enzimática.

A influência da concentração de sacarose no meio reacional foi detectada por TSUCHIYA et al. (1953), obtendo apenas dextranas de alto peso molecular com 10% de sacarose, enquanto com

concentração de 70%, apenas dextranas de baixo peso (8.000 daltons) foram detectadas. Em concentrações intermediárias, uma distribuição bimodal de peso molecular foi verificada, com uma porção distribuída em torno de 40 milhões e outra em torno de 30.000 daltons. Dando continuidade a estes estudos, TSUCHIYA et al. (1955), justificaram o efeito da concentração de sacarose no peso molecular pelo maior acúmulo de frutose em altas concentrações de sacarose. Mantendo a concentração de frutose constante em 2,5; 5,0 e 10% houve, no primeiro caso, formação apenas de espécies de alto peso molecular. A 5% a maioria do polímero sintetizado era de alto peso molecular e a 10% apenas 35% do produto correspondia a essa espécie.

BRASWELL & STERN (1959) perceberam um decréscimo na viscosidade intrínseca do meio ao longo do tempo, mesmo em baixas concentrações de frutose (adiconada no início da reação), sugerindo que além da formação de dextrana de baixo peso molecular, a diminuição da viscosidade seria devido ao aumento das ramificações.

Dando continuidade a esses estudos, BRASWELL et al. (1962), confirmaram o aumento nas ramificações com a conversão, constatando ainda que o aumento da concentração de sacarose torna a reação mais lenta, havendo um aumento na linearidade da cadeia, para uma mesma conversão.

MONSAN & LOPEZ (1981), utilizando técnicas mais avançadas de determinação de peso molecular, acompanharam esta característica ao longo do tempo de reação, com concentração inicial de

sacarose de 100 g/l. O peso molecular aumentou com a conversão, sendo a distribuição mais dispersa no início da síntese, como pode ser observado na Figura 11.

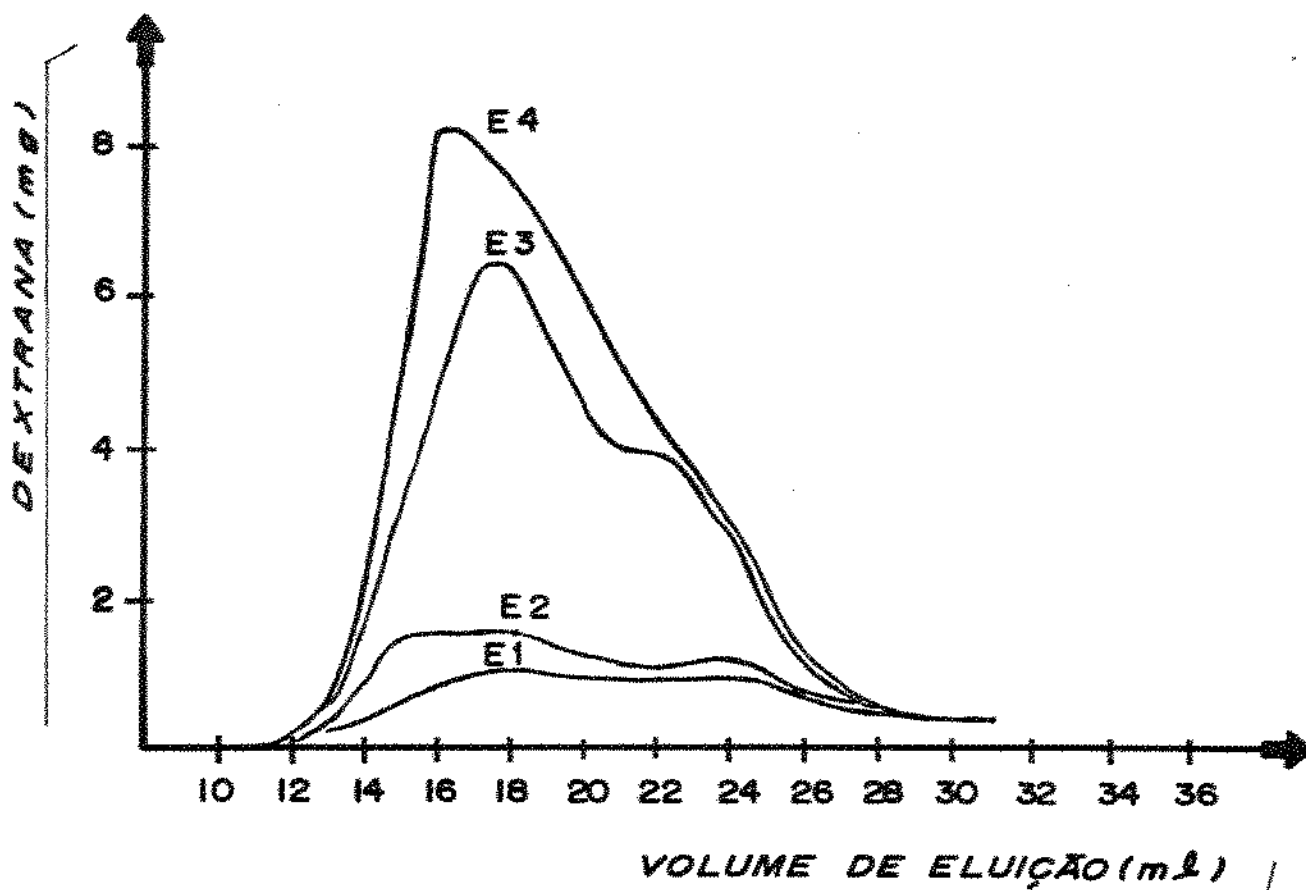


Figura 11: Distribuição do peso molecular em diferentes tempos de reação ($E_1 = 25$ min; $E_2 = 50$ min; $E_3 = 131$ min; $E_4 = 190$ min). Dextrana foi fracionada por GPC em Ultrogel A2 (MONSAN & LOPEZ (1981b))

ALSOP (1983) estudou o efeito de vários parâmetros da síntese enzimática em condições industriais, através de técnicas de cromatografia de permeação em gel (GPC), concluindo que o parâmetro mais importante é a concentração da sacarose, controlando tanto o rendimento quanto a distribuição de peso molecular. Um resumo dos resultados obtidos está apresentado na Tabela 7.

Tabela 7: Rendimentos das frações de carboidratos em várias concentrações de sacarose (g/100 g de sacarose), no final da reação (ALSOP (1983))

Sacarose (% p/v)	Monossa- carídeos	Dissaca- rídeos	Dextrana Total	Dextrana Alto P.M.	Dextrana Baixo P.M.
2	52,2	1,9	45,9	45,9	0
4	50,0	4,4	45,6	45,6	0
5	51,3	4,3	44,4	44,4	0
10	51,2	6,8	42,0	39,0	3,0
15	55,5	9,4	35,3	25,3	10,0
20	56,9	11,2	31,9	17,9	14,0
Teórico	52,6	0	47,4	47,4	0

Com o aumento da concentração de sacarose uma série de alterações ocorrem: (1) a quantidade de monossacarídeos (principalmente frutose) aumenta além do esperado; (2) a quantidade de dissacarídeos (principalmente leucrose, mas um pouco de sacarose e isomaltose) aumenta consideravelmente; (3) a quantidade de dextranas de baixo peso molecular ($PM < 5000$) aumenta, principalmente acima de 10% de sacarose. Como consequência disso o rendimento em dextranas de alto peso decresce bastante.

PRAT et al. (1987) obteve um aumento no rendimento de dextrana obtida a partir de 150 g/l de sacarose, com a complexação da frutose produzida com íons borato, minimizando seu efeito de acceptor e formação de leucrose.

Com o crescente interesse na produção de dextrana clínica ($50.000 < PM < 100.000$), o efeito de pequenos oligossacarídeos, como maltose e isomaltose, além de dextrana de baixo peso molecu-

lar, no peso molecular da dextrana obtida tem sido amplamente estudada.

Já em 1946, HEHRE detectou alterações na cinética enzimática com a adição de dextrana purificada no meio reacional.

KOEPSSELL et al. (1952) estudaram o comportamento da síntese enzimática na presença de vários açúcares como maltose, isomaltose, α -metil glicosídeo, glicose, frutose, melibiose, galactose e outros. Maltose, isomaltose, α -metil glicosídeo aumentaram a taxa de reação, sendo detectada a presença de oligossacarídeos além das cadeias longas, levando-os a sugerir que estes açúcares eram mais eficientes como iniciadores do que os outros.

A introdução de dextrana proveniente de hidrólise da dextrana nativa, e maltose no caldo fermentativo, foi estudada por NADEL et al. (1953), na intenção de produzir dextrana clínica diretamente da fermentação. Segundo os autores, houve formação da dextrana de interesse apenas nos experimentos onde dextrana hidrolisada foi adicionada, com rendimentos superiores aos processos até então utilizados.

HEHRE (1953) comparou a ação de vários açúcares e de dextrana de baixo peso molecular, concluindo que esta é tão eficiente quanto maltose e isomaltose na modificação de peso molecular. Resultados semelhantes foram obtidos por TSUCHIYA et al. (1955) e HELLMAN et al. (1955).

Resultados interessantes foram obtidos por KILLEY et al. (1955) no estudo da formação de panose (4- α -isomaldopiranosil-D-glicose) pela ação da dextrana-sacarase sobre sacarose, na presen-

ça de altas concentrações de maltose. Dentre os parâmetros estudados, os investigadores concluíram que o fator que mais influenciava na síntese era a razão $[maltose]/[sacarose]$, seguida da concentração de maltose. Este estudo mostra que quanto maior a concentração de maltose, menor o peso molecular das espécies formadas.

Processos de produção de dextrana clínica utilizando dextrana de baixo peso molecular como acceptor foram patenteados, como o de HELLMAN & TSUCHIYA (1955) e BEHRENS & RINGSPFEIL (1962).

Vários aceptores vêm sendo testados desde a década de 60, como dextrana de baixo peso molecular (BEHRENS & RINGSPFEIL (1961)), frutose, glicose, sorbitol (EBERT & SCHENK (1968)), rafinose (NEELY (1959)), no entanto apenas a partir do desenvolvimento de técnicas mais avançadas de determinação de peso molecular, como a cromatografia de permeação em gel, resultados mais práticos e conclusivos foram obtidos. A Figura 12 apresenta um cromatograma de produtos de síntese enzimática, com e sem aceptores.

Com objetivo de produzir dextranas clínicas, MONSAN & LOPEZ (1981a) conseguiram bons resultados utilizando oligossacarídeos, produzidos a partir de síntese de dextrana na presença de maltose. Foram estudados também o uso apenas da maltose e de dextranas com peso molecular entre 9.400 e 40.000 daltons, sempre mantendo a razão R, $[acceptor]/[sacarose]$ igual a 0,1, com enzima livre e imobilizada.

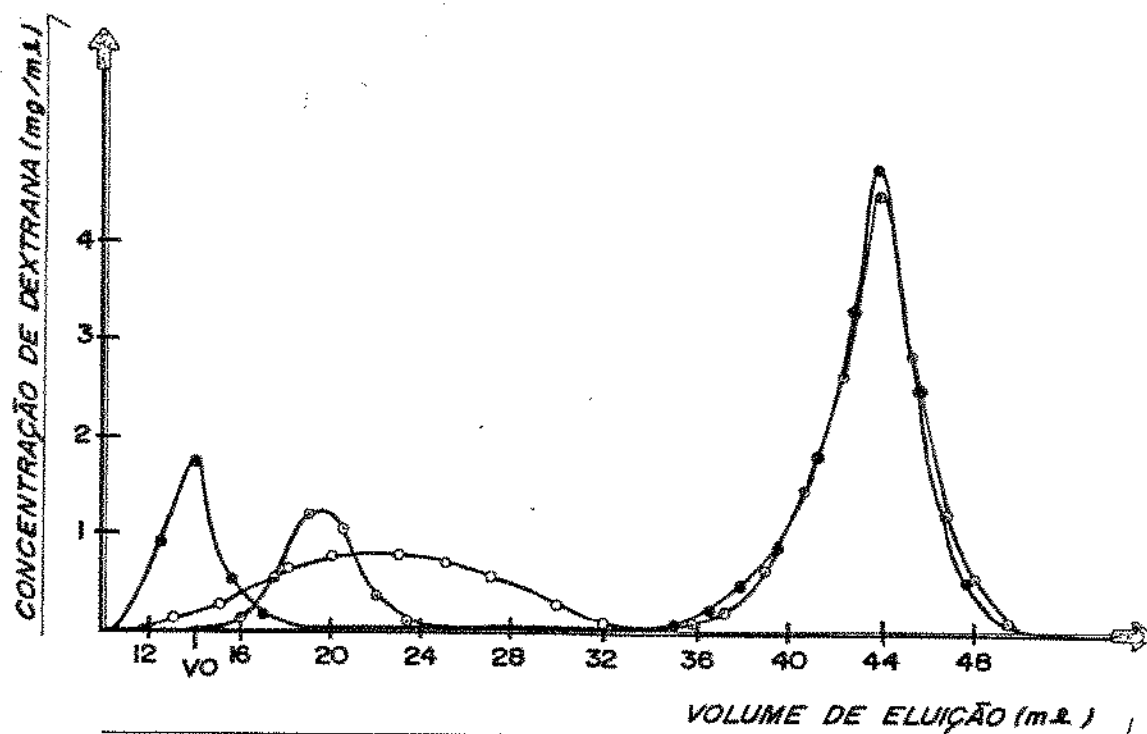


Figura 12: GPC de preparações de dextrana com enzima livre. Condições de reação: atividade = 3,2 U/ml; concentração de sacarose = 200 g/l e 30°C. Sem acceptor (—●—●—), com 20 g/l de oligossacarídeos derivados de síntese com maltose (—○—○—), padrão de dextrana clínica ($\overline{PM}$ = 75.000) (—○—○—) (MONSAN & LOPEZ (1981a))

O efeito de dextranas com diferentes pesos moleculares no peso molecular médio e na polidispersão, foi estudado por ALSOP (1983), assim como o efeito da glicose por SMILEY (1982).

O efeito de vários açúcares como aceptores na síntese de dextrana foi estudado por ROBYT & EKLUND (1983). A maltose foi considerada o acceptor mais eficiente, com mais de 75% dos grupos glicosílicos da sacarose formando oligossacarídeos. Outros aceptores que dão origem a uma série de oligossacarídeos são (em ordem decrescente de efetividade): isomaltose, nigerose; α -metil glico-

sídeo, 1,5-anidro-D-glucitol; D-glicose; furanose; β -metil glicosídeo; celobiose e L-sorbose. A Figura 13 ilustra os resultados obtidos com todos os aceptores testados.

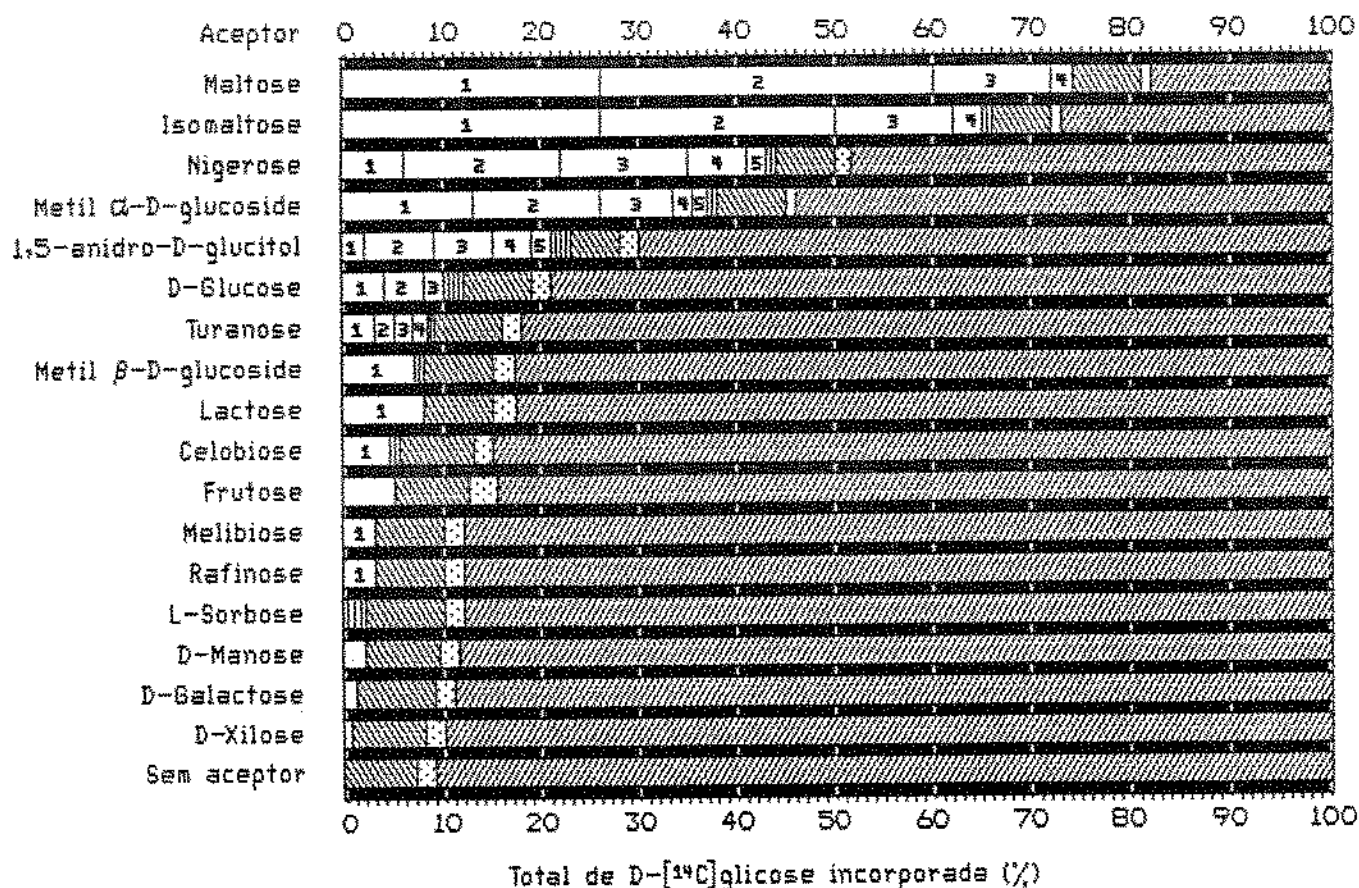


Figura 13: Distribuição de D-[¹⁴C] glicose da sacarose em produtos de reação com aceptores. Membros de séries de oligosacarídeos produzidos são mostrados em ordem crescente de polimerização da esquerda para a direita, com o número de unidades D-glicosílicas adicionadas mostradas onde possível. D-frutose e D-manose produzem cada um, dois produtos monoglicosilados (ROBYT & EKLUND (1983))

ORIOL et al. (1985) sintetizaram oligossacarídeos de diversos pesos moleculares utilizando maltose como acceptor, com R igual a 0,4. Os oligossacarídeos assim obtidos, isolados e purificados foram utilizados como aceptores e sua influência avaliada do ponto de vista cinético e da qualidade do produto formado. Os resultados mostraram que o número de espécies com diferentes graus de polimerização aumenta com a diminuição da razão [acceptor]/[sacarose]. Para uma razão constante, o número de espécies moleculares formadas, aumenta com o grau de polimerização do acceptor utilizado. O mesmo comportamento foi observado nos parâmetros cinéticos com relação à concentração e peso molecular do acceptor.

TAILLANDIER (1986), também efetuou ensaios de produção de dextrana de peso molecular controlado em cinco etapas, utilizando pequenos oligossacarídeos obtidos da síntese com maltose, como aceptores.

Os estudos realizados por PAUL et al. (1986), utilizando maltose e oligossacarídeos como aceptores, levou à proposição de equações relacionando o peso molecular das espécies formadas com o peso molecular dos aceptores utilizados e a razão da concentração de sacarose pela concentração do acceptor. As figuras 14 e 15 ilustram os resultados obtidos.

Com o uso de maltose foi obtida a seguinte correlação:

$$PM = 340(1 + 0,48 S/M)$$

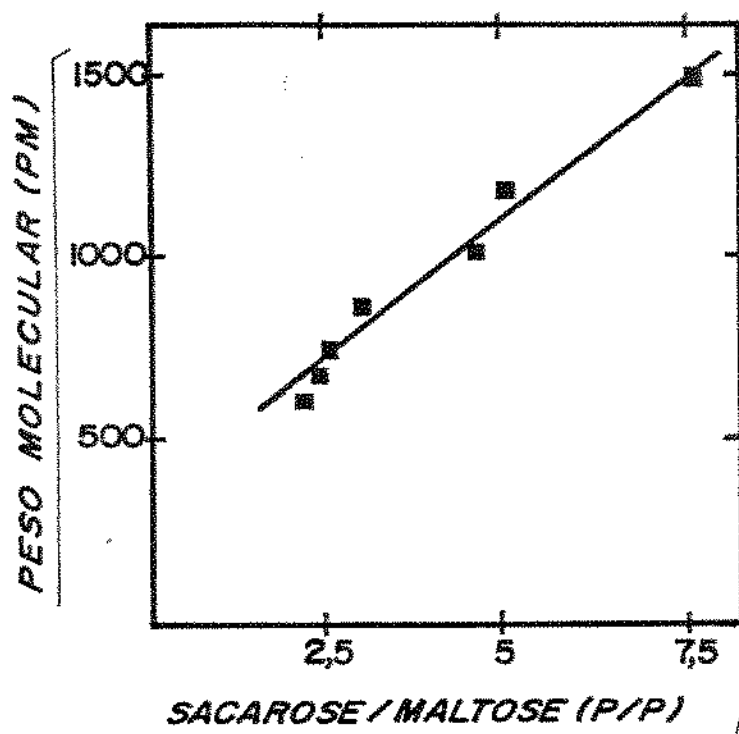


Figura 14: Peso molecular médio dos oligossacarídeos produzidos na presença de maltose como acceptor em função da razão [sacarose]/[maltose] ([S]/[M]) - PAUL et al. (1986)

Com a utilização de oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares como aceptores, foi obtida a seguinte correlação:

$$PM = PM_A (1 + 0,474 S/A)$$

Os resultados obtidos confirmaram aqueles de ORIOL et al. (1985), havendo aumento na produção de dextrana de alto PM com aumento de S/M e diminuição no rendimento de oligossacarídeos, sendo o peso molecular destes maior.

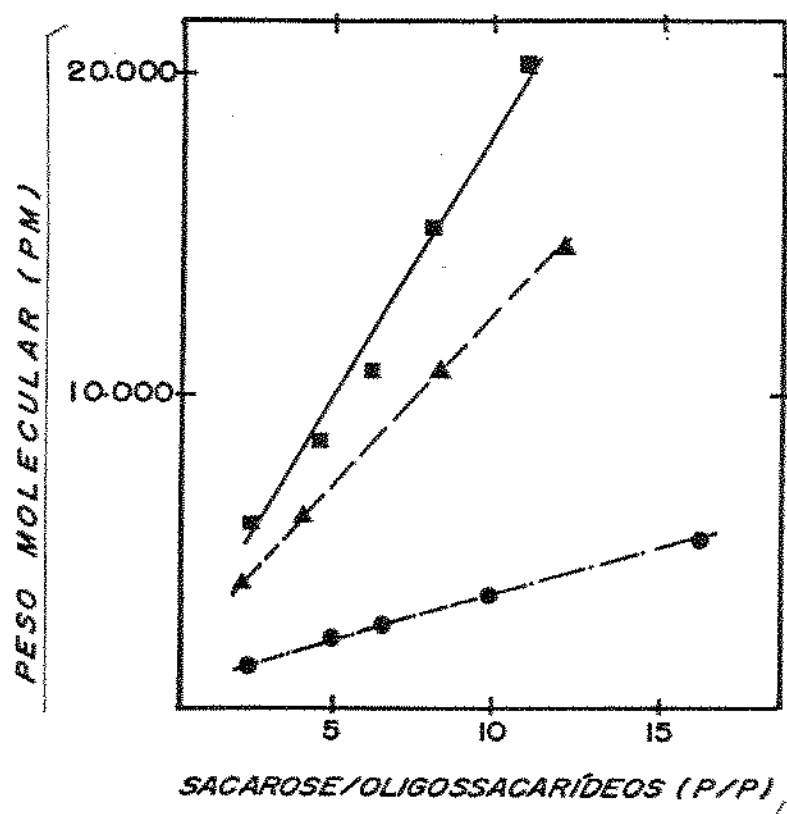


Figura 15: Peso molecular médio das dextranas produzidas na presença de oligossacarídeos como aceptores em função da razão [sacarose]/[oligossacarídeos] (S/A) (*) oligossacarídeo com PM = 830; (Δ) oligossacarídeos com PM = 1150 e (■) oligossacarídeos com PM = 1970 - PAUL et al. (1986)

Doutros fatores que influenciam no peso molecular da dextrana formada são, além dos aceptores, temperatura e concentração enzimática, embora em menores proporções.

Segundo TSUCHIYA et al. (1955), o abaixamento da temperatura de 30° para 15°C em reações com acceptor reduz o rendimento da dextrana de alto peso molecular e aumenta o da de baixo peso, havendo um ligeiro aumento no peso molecular destas espécies a 15°C. Embora a formação das dextranas de alto peso não seja elimi-

nada a 10° e 4°C, há um decréscimo marcante na sua produção. A influência da concentração enzimática em reações com aceptores a 15 e 30°C foi também estudada. A 30°C verificou-se que em altas concentrações de dextrana-sacarase, há um decréscimo no rendimento das dextranas de alto peso molecular. Este efeito é bem menos marcante a 15°C.

Praticamente os mesmos resultados são também apresentados por HELLMAN et al. (1955).

BRASWELL & GOODMAN (1962) estudaram o efeito da temperatura em reações enzimáticas sem aceptores, concluindo que quanto menor a temperatura, menor o peso molecular da dextrana formada e menor o grau de ramificações.

Segundo PAUL et al. (1986) os efeitos da temperatura (de 4° a 29°C) e da concentração enzimática (4 a 100 UDS/ml) não são significativos, em comparação à concentração de sacarose e razão [sacarose]/[maltose].

4. FERRO-DEXTRANA

4.1. CARACTERÍSTICAS

Estudos na estrutura do complexo de Fe-dextrana por cromatografia de permeação em gel, e ultracentrifugação foram feitos por RICKETS et al. (1955). Nas análises cromatográficas, foi verificado que o pico correspondente à Fe-dextrana está entre aqueles previamente encontrados para dextrana de PM = 75000 e 40000. No entanto, como o ferro é absorvido na coluna, este fato não pode ser utilizado para determinação de peso molecular. Os ensaios de

ultracentrifugação mostraram grande proporção de dextrana não complexada (42,2%). A razão entre ferro e dextrana numa solução isenta de dextrana livre corresponde a 2,4 partes de dextrana para uma de ferro, parecendo haver ligações cruzadas ou associação de moléculas na formação do complexo.

Estudos com auxílio de microscopia eletrônica realizados por MARSHALL & RUTHERFORD (1971) em preparações comerciais de ferro-dextrana, demonstraram que as moléculas de Fe-dextrana contêm um núcleo elétron denso composto de β -FeOOH, circundado por uma camada elétron-transparente, composta de dextrana.

Segundo COX et al. (1971), FUJITA & TERATO (1968) sugeriram que a absorção da dextrana no óxido de ferro ocorreria através do terminal redutor da unidade de glicose na cadeia de dextrana. COX et al. (1971) entretanto mostraram que apenas quando a glicose terminal é convertida em um derivado, como ácido metassacarínico ocorre a complexação (BREMNER et al. (1969)), sugerindo que a unidade terminal alterada se liga à superfície do componente FeOOH, formando estrutura semelhante à representada na Figura 16.

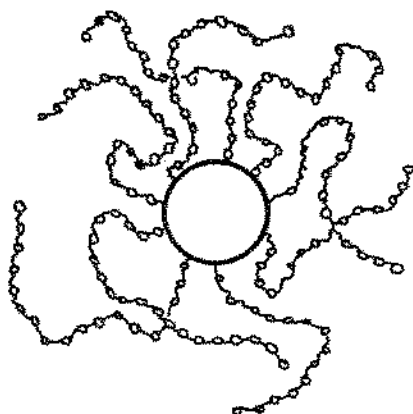


Figura 16: Representação bidimensional sugerida por COX et al. (1971) para o complexo de Fe-dextrana

O complexo em solução é bastante estável, sob refrigeração ou à temperatura ambiente, não tendo sido detectada redução no conteúdo de ferro ou precipitação (WAN & TSALLAS (1980)).

4.2. UTILIZAÇÃO

A solução de Fe-dextrana é a preparação parenteral de escolha no tratamento e profilaxia de anemia carencial de animais e humanos nos Estados Unidos.

O ferro da molécula só se torna disponível ao organismo depois que o complexo é fagocitado pelas células reticuloendoteliais, sendo então processado e liberado para o plasma.

A aplicação intramuscular, causa reações locais, incluindo desconforto e descoloração da pele no local da injeção, o que limita o uso intramuscular, que é utilizado apenas quando a infusão intravenosa é inacessível (GOODMAN & GILMAN (1985)).

4.3. MERCADO

A ferro-dextrana vem sendo utilizada nos Estados Unidos no tratamento profilático da anemia em porcos, sendo o produto com maior consumo a solução a 10% de ferro, seguido da solução 20%. O mercado total deste produto veterinário vem aumentando a uma taxa de aproximadamente 4% ao ano devido ao aumento no consumo de carne de porco. Os significativos aumentos na eficiência da produção de ferro-dextrana têm possibilitado nos últimos anos a fixação de preços mais competitivos.

Nos Estados Unidos, estima-se um mercado de 10 milhões de dólares para medicamentos destinados ao tratamento de anemia em humanos, cuja incidência vem aumentando nas populações mais pobres. Os estudos para a utilização da ferro-dextrana para uso humano vêm sendo implementados, já que este produto pode capturar uma porção significativa deste mercado. A Tabela 8 traz o preço unitário de algumas preparações de ferro-dextrana.

Tabela 8: Preço FOB das várias apresentações de ferro-dextrana, fornecidas pela D & O Chemicals, Inc. (New Jersey - USA)

Apresentação	Preço Unitário (US\$/kg ou l)
solução 5% Fe (grau humano) ^(a)	21,75
solução 10% Fe (grau veterinário)	8,75
solução 20% Fe (grau veterinário)	22,85
pó para solução 10% ^(b)	44,85
pó para solução 20%	99,00

(a) o lote mínimo de fornecimento das soluções é 200 l

(b) o lote mínimo de fornecimento dos sólidos é 20 kg

Os dados referentes a mercado interno são bastante escassos, não havendo referências a produtores nacionais de ferro-dextrana. A solução de ferro-dextrana para uso veterinário é comercializada por algumas empresas nacionais, com diferentes denominações, como apresentado na Tabela 9.

Tabela 9: Fornecedores de preparações de Fe-dextrana no Brasil

Empresa	Empresa
Tortuga	Ferrodex
Terson	Gleptosil
Salsburry	Dexsol
Farmagropecuária	Dextranol
Fartec	Roferton

Na Tabela 10 constam alguns produtores mundiais de ferro-dextrana.

Tabela 10: Principais produtores mundiais de Fe-dextrana

Produtor	País
Dextran Products, Ltd.	Canadá
Polafarma S.A.	México
Lederle Ltd.	Japão
Biofac A/S	Dinamarca
Società Prodotti Antibiotici SpA	Itália
Polidex Pharmaceuticals	Estados Unidos

III. MATERIAL E METODOS

1. MICROORGANISMO

Nas fermentações realizadas foi utilizado *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F, que segundo trabalhos publicados até o momento, apresenta maior produtividade, sendo esta linhagem usada em praticamente toda produção industrial.

O microrganismo foi obtido através de convênio com o Institut National des Sciences Appliqués de Toulouse - França, na forma liofilizada. As culturas estoque foram preparadas pela suspensão do liofilizado em solução salina (cloreto de sódio a 0,9%) e esta inoculada em meio padrão, mantido em shaker por 14 horas a 25°C. A partir dessa fermentação, foram feitas mais duas repicagens, sendo obtido na segunda um volume de 200 ml.

O caldo foi então fermentado a 25°C e ao final de 6 horas, foram retiradas as alíquotas para congelamento, sendo observadas nesta etapa, rigorosos critérios de esterilidade de todo material utilizado, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação. As alíquotas foi adicionada solução de glicerol 20%, para obter uma concentração final de 10%, sendo então as culturas congeladas a -15°C.

Constatou-se empiricamente pela avaliação periódica de atividade enzimática, que as culturas estoque têm boa viabilidade pelo período máximo de 1 mês, quando nova repicagem em meio padrão se faz necessária.

2. MEIO DE CULTURA

o Meio Padrão

- Sacarose 40 g/l
- Extrato de levedura 20 g/l
- Fosfato de potássio dibásico 20 g/l
- Sulfato de magnésio 0,2 g/l
- Cloreto de sódio 0,01 g/l
- Sulfato ferroso 0,01 g/l
- Sulfato de manganês 0,01 g/l
- Cloreto de cálcio 0,02 g/l

pH = 6,7

Os sais são adicionados a partir de soluções preparadas da seguinte forma:

o Solução A:

- Sulfato de magnésio 200 g/l
- Sulfato de manganês 10 g/l
- Cloreto de sódio 10 g/l
- Sulfato ferroso 10 g/l
- Cloreto de cálcio 20 g/l

o Solução B:

- Fosfato de potássio dibásico 200 g/l

Na preparação do meio de fermentação, foram dissolvidos a sacarose e o extrato de levedura, adicionando-se uma alíquota da solução A suficiente para a obtenção das concentrações desejadas. Depois da esterilização do meio a 121°C por quinze minutos, foi

adicionado assepticamente um volume determinado da solução B previamente esterilizada para adequação das concentrações dos vários nutrientes.

A solução de fosfato deve ser esterilizada separadamente para evitar precipitação, constatada experimentalmente quando este sal é autoclavado em presença dos demais componentes do meio.

3. CONDIÇÕES DE CULTURA

a) Preparo do inóculo

Para a preparação do inóculo, foram utilizados erlenmeyers de 500 ml contendo 190 ml de meio padrão, aos quais foram adicionados depois de esterilização (121°C por 15 minutos) e resfriamento, 10 ml de cultura estoque. Os meios assim inoculados, foram incubados a 25°C por 14-16 horas em "shaker" com rotação de 150 rpm.

b) Fermentação

Foram utilizados fermentadores Bioflo III da New Brunswick Scientific Co., Inc. com capacidade de 5 litros, contendo inicialmente 2,5 litros de meio de cultura. Nas fermentações com controle de pH, este foi mantido em $6,7 \pm 0,2$ pela adição de solução de NaOH 3N ou solução alcalina de sacarose (NaOH 3N, sacarose 60%), através do controle automático de pH do fermentador, sendo bombeadas de um frasco erlenmeyer equipado com respiro com filtro esterilizante Millex FB50 da Millipore Co.

As soluções utilizadas nas fermentações tais como meio nutriente, NaOH 3N e/ou solução alcalina de sacarose e fosfato dibásico de potássio foram esterilizados separadamente a 121°C por 15 minutos.

O inóculo de 5% utilizado foi preparado como descrito no item anterior.

As fermentações foram mantidas a 25°C por 7-8 horas.

4. CONDIÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO

a) Obtenção do concentrado enzimático

O caldo fermentado obtido teve seu pH acertado para 5,2±0,2 com ácido fosfórico e a seguir centrifugado a 12.000 g a 4°C por 30 minutos, em centrífuga modelo RC-5C da Sorvall, para separação das células bacterianas. O concentrado enzimático livre das células foi então congelado em frascos fechados contendo 150 ml de caldo em média.

b) Obtenção de dextrana

As polimerizações foram realizadas em balões de três bocas de 250 ml, contendo entre 180 e 200 ml de volume reacional. Os balões de reação utilizados foram equipados com agitação mecânica e termômetro, imersos em banho termostatzado para manutenção da temperatura (Figura 17).

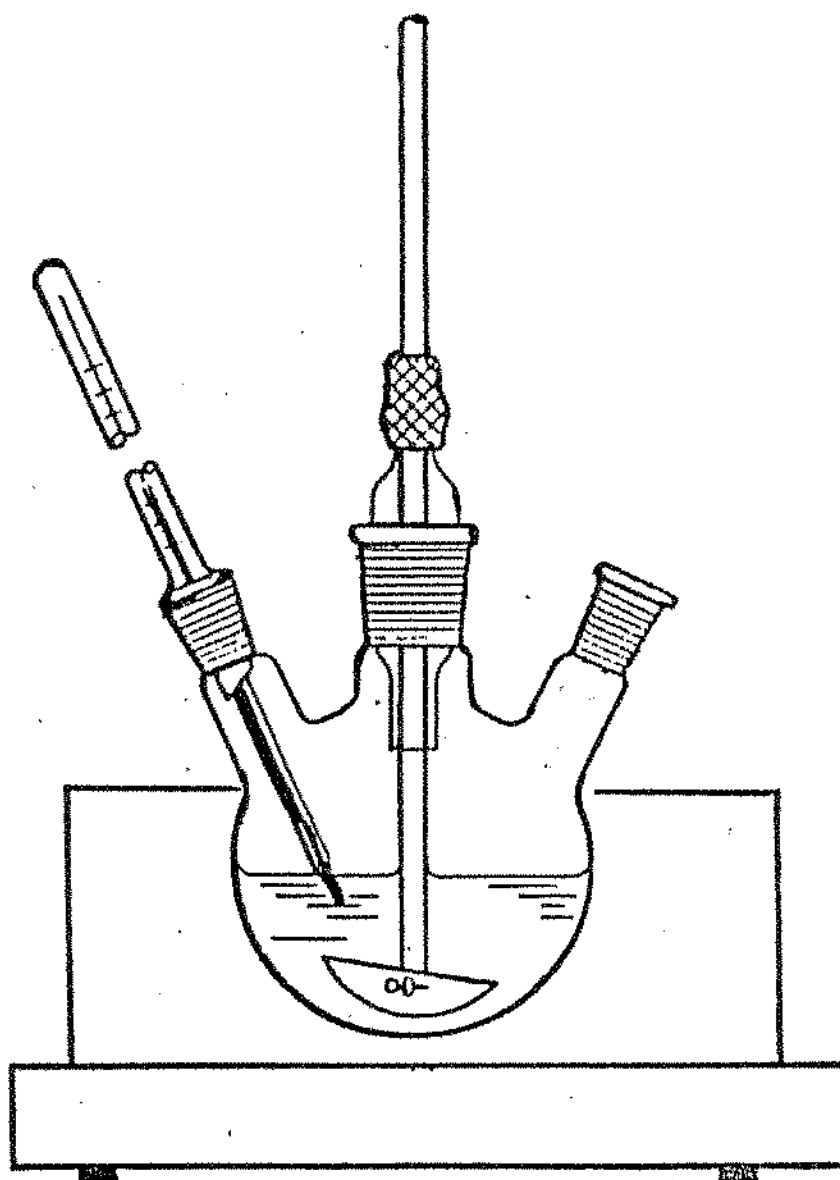


Figura 17: Esquema dos equipamentos usados na síntese enzimática

Foram adicionados aos balões, soluções de sacarose e maltose em diversas concentrações, seguidas do concentrado enzimático descongelado, em volumes adequados para obtenção de atividade em torno de 30 UDS/ml e de concentrações iniciais determinadas dos açúcares em estudo.

Em cada um dos ensaios foram retiradas amostras em intervalos regulares de tempo para dosagem de açúcar redutor, tendo como indicativo do final da reação, pelo menos dois valores constantes, ou uma tendência de estabilização.

A temperatura da reação foi mantida em 25°C.

5. MÉTODOS ANALÍTICOS

a) Crescimento celular

O crescimento do microrganismo foi determinado espectrofotometricamente através de leitura de absorbância a 650 nm, utilizando água destilada para calibração do aparelho. Para a avaliação da massa celular foi construída uma curva padrão relacionando a absorbância com a massa celular seca.

A curva padrão (Figura 18) foi obtida através da determinação de massa seca e absorbância a 650 nm do cultivo em meio padrão em frascos agitados. A massa seca foi determinada pela centrifugação do caldo fermentado em tubos previamente pesados, ressusensão das células em água destilada para eliminação de possíveis resíduos de dextrana, seguida de nova centrifugação. A massa celular assim obtida foi seca em estufa até peso constante e a massa relacionada ao valor da absorbância medida.

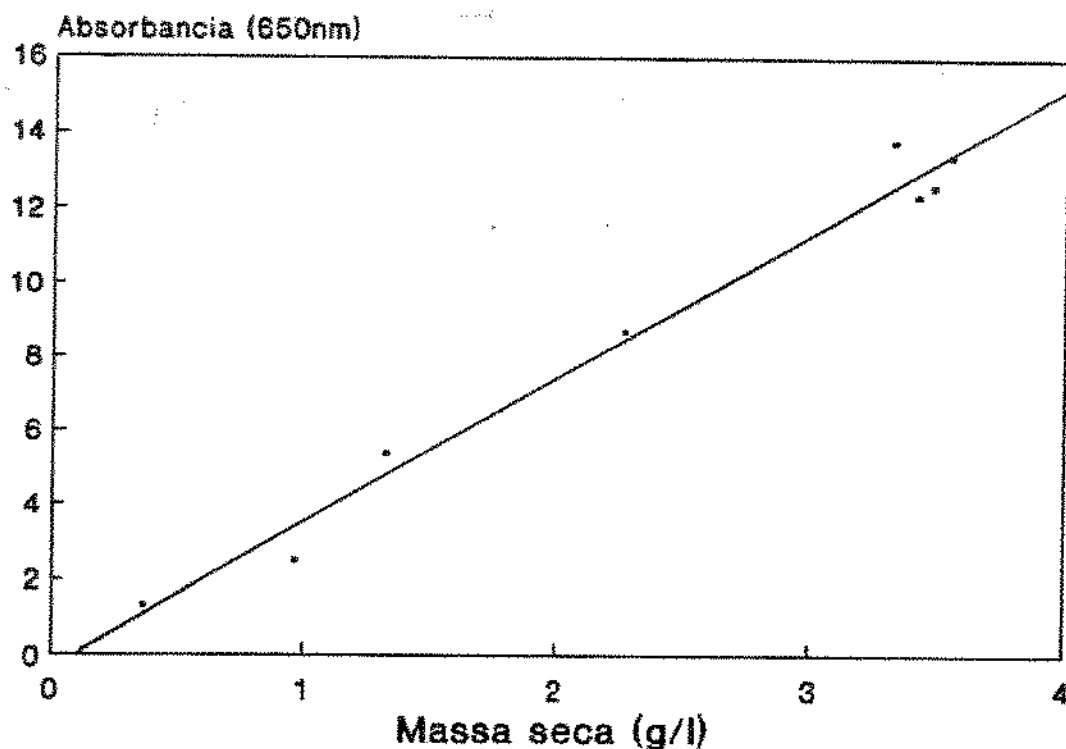


Figura 18: Curva de referência da absorbância a 650 nm versus massa seca para *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F

b) Determinação de açúcares redutores - Método DNS
(MILLER (1959))

o Reagente DNS:

Misturar:

- Água destilada 1416 ml
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) 10,6 g
- NaOH 19,8 g

Dissolver a quente e adicionar:

- Fenol (fundido a 50°C) 7,6 ml
- Metabissulfito de sódio 8,3 g

Este método consiste na reação de 1 ml de amostra convenientemente diluída com 1 ml do reagente acima descrito, aquecendo-se a seguir a 100°C por 5 minutos. Resfria-se imediatamente em banho de gelo e adiciona-se solução de tartarato de sódio e potássio (11,25 g/l). O branco é feito pela substituição da amostra por água destilada.

A reação de DNS com açúcares redutores produz uma coloração amarela, cuja intensidade é proporcional à concentração de açúcares redutores presentes na amostra. Esta correlação foi obtida através de uma curva padrão, onde soluções com concentrações conhecidas de glicose foram submetidos ao teste, fazendo-se a leitura de absorbância a 540 nm em espectrofotômetro modelo B 382 da Micronal. A cada preparação de novo reagente, uma curva padrão de absorbância versus concentração de açúcares redutores foi elaborada.

c) Determinação da Atividade enzimática (HEHRE (1955))

A determinação de atividade enzimática foi feita em amostras iniciais de polimerização e no acompanhamento das fermentações. Neste último caso as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 30 minutos a 4°C e o pH do sobrenadante acertado para 5,2±0,2 com ácido ortofosfórico.

A atividade foi determinada medindo-se a velocidade inicial de produção de frutose, pela ação da dextrana-sacarase sobre a sacarose em condições controladas.

Em um recipiente de vidro encamisado para manutenção da temperatura em 30°C, e com agitação magnética, foram adicionados:

Solução de sacarose 600g/l 2,0 ml
Tampão acetato (pH 5,2) 0,5 ml
Água destilada 8,5 ml

Depois de convenientemente homogeneizada, foi adicionada à solução 1 ml de amostra, obtendo-se assim uma concentração final de sacarose de 100 g/l.

Durante 12 minutos foram retiradas aliquotas de 1 ml de 3 em 3 minutos, sendo adicionado imediatamente a cada uma, 1 ml de reagente DNS fazendo a seguir o procedimento para dosagem de açúcares redutores (item b).

A evolução da absorbância é plotada em função do tempo e a inclinação da reta obtida, permite calcular a velocidade de produção de frutose. Este procedimento gráfico foi substituído por uma solução analítica, tendo sido feita uma regressão linear.

Com estes valores e a curva padrão do DNS, foi obtida a atividade enzimática expressa em UDS (unidade de dextrana-sacarase), que equivale à quantidade de enzima necessária a liberação de 1 mg de frutose em 1 hora a 30°C, pH 5,2 e concentração de substrato de 10%.

d) Determinação de Dextrana

Segundo DIMLER et al. (1954), a dextrana pode ser dosada através dos resíduos glicosídicos provenientes de sua hidrólise total, havendo no entanto pequena perda do monossacarídeo nas condições hidrolíticas.

A massa reacional proveniente da polimerização contém, além da dextrana, resíduos de sacarose e pequenos oligossacarídeos

e grande quantidade de frutose, que interferem na dosagem da dextrana. Foram feitas diálises para a eliminação desses interferentes utilizando membranas Spectra/Por da Spectrum Medical Industries, Inc. com peso molecular de corte de 6.000 a 8.000 e membranas de celulose benzoilada da Sigma Chemical Co. com peso molecular de corte em torno de 1.200.

Aliquotas de 4 ml de amostra previamente pesada e convenientemente diluídas, foram submetidas à diálise por um período de 24 a 36 horas em água corrente.

Na determinação de dextrana propriamente dita, foram usados volumes de 1 a 5 ml (dependendo da concentração da amostra) do caldo previamente dialisado e o volume completado para 5 ml quando necessário, adicionando a seguir 5 ml de ácido sulfúrico 8 N. Depois de agitação vigorosa a mistura foi submetida a aquecimento a 100°C por 75 minutos, resfriando-se a seguir em banho de gelo. A solução ácida foram adicionados 20 ml de solução de NaOH 2 N, o pH foi acertado para 6-7 e o volume completado para 50 ml. A mistura neutralizada foi utilizada na determinação de glicose feita pelo método da glicose-oxidase/peroxidase, sendo usado um kit da Labtest (DIMLER et al. (1954)).

A concentração de dextrana é então obtida através da cor-relação:

$$[\text{dextrana}] = [\text{glicose}] * \text{diluição} * 0,936$$

O fator 0,936 resulta do fato de que teoricamente 0,9 g de dextrana produzem 1,0 g de glicose, mas nas condições de hidrólise apenas 0,962 g são obtidas ($0,9/0,962 = 0,936$).

e) Determinação de glicose - Método glicose-oxidase/pe-
roxidase (Labtest)

A determinação de glicose foi feita para a dosagem de dextrana, tendo sido usado método enzimático com glicose oxidase e peroxidase, onde há o desenvolvimento de cor vermelha, cuja intensidade é proporcional à concentração de glicose.

O Kit é composto de um "tampão de uso" e um "reagente de cor", cuja composição é a seguinte:

Tampão fosfato	0,1 mol/l
Tampão tris	0,05 mol/l (pH=8)
Glicose oxidase	≥ 8000 U/l
Peroxidase	≥ 800 U/l
4-aminoantipirina	0,78 mmol/l
Fenol	2,7 mmol/l

conservantes, estabilizantes e ativadores.

O "reagente de cor" é dissolvido em 250 ml do "tampão de uso" e estocado a 5°C para utilização nas determinações.

Para a dosagem foram usados 20 µl da amostra hidrolisada, neutralizada e diluída, aos quais foram adicionados 2 ml do "reagente de cor". A mistura foi homogeneizada com agitação vigorosa e mantida em banho termostatizado a 37°C por 30 minutos. A intensidade da cor desenvolvida foi relacionada à concentração de glicose pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 505 nm, utilizando uma curva padrão previamente elaborada. É feito um branco utilizando solução composta de 1 ml de H₂SO₄ 8 N, 4 ml de NaOH 2 N e 5 ml de água.

Para cada Kit utilizado, foi construída nova curva padrão.

f) Cromatografia de permeação em gel (HPLC) (BRAGA, Z. M.; CURRALERO, I.C.B.; ROCHA, A.L. (1990))

Este método foi utilizado para determinação do peso molecular médio das dextranas obtidas nas diferentes condições de ensaio, bem como de suas quantidades relativas (KATO et al (1980)).

As amostras a serem injetadas foram tratadas para eliminação das proteínas e precipitação da dextrana. Foram pesadas aproximadamente 2 g de amostra e adicionados 0,1 ml de ácido perclórico concentrado e depois de agitação vigorosa a amostra foi centrifugada a 12000 g por 10 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 15 ml de etanol 95% e depois de agitada, a suspensão foi mantida em freezer por 30 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado e o precipitado liofilizado para posterior injeção.

O sistema de cromatografia líquida utilizado foi o seguinte:

Bomba modelo Varian 2010

Detetor modelo Waters 410 - índice de refração

Integrador modelo Varian 4270

Colunas Varian série MicroPack:

- TSKB 2500 PWXL
- TSKB 4000 PWXL
- TSKB 5000 PWXL

Diâmetro interno 7,8 mm

Comprimento 300 mm

Foram utilizadas as três colunas em série, para todas as amostras, usando água como eluente. Para as determinações, as amostras foram dissolvidas em água destilada e diluídas até concentrações variando de 0,7 a 7,0 %.

Foram usados padrões de dextrana de pesos moleculares 2×10^6 , 4×10^4 , 2×10^4 , 11×10^3 , 9×10^3 além de glicose, para a obtenção de uma equação relacionando os pesos moleculares médios e os tempos de retenção (t_R) apresentados nos cromatogramas.

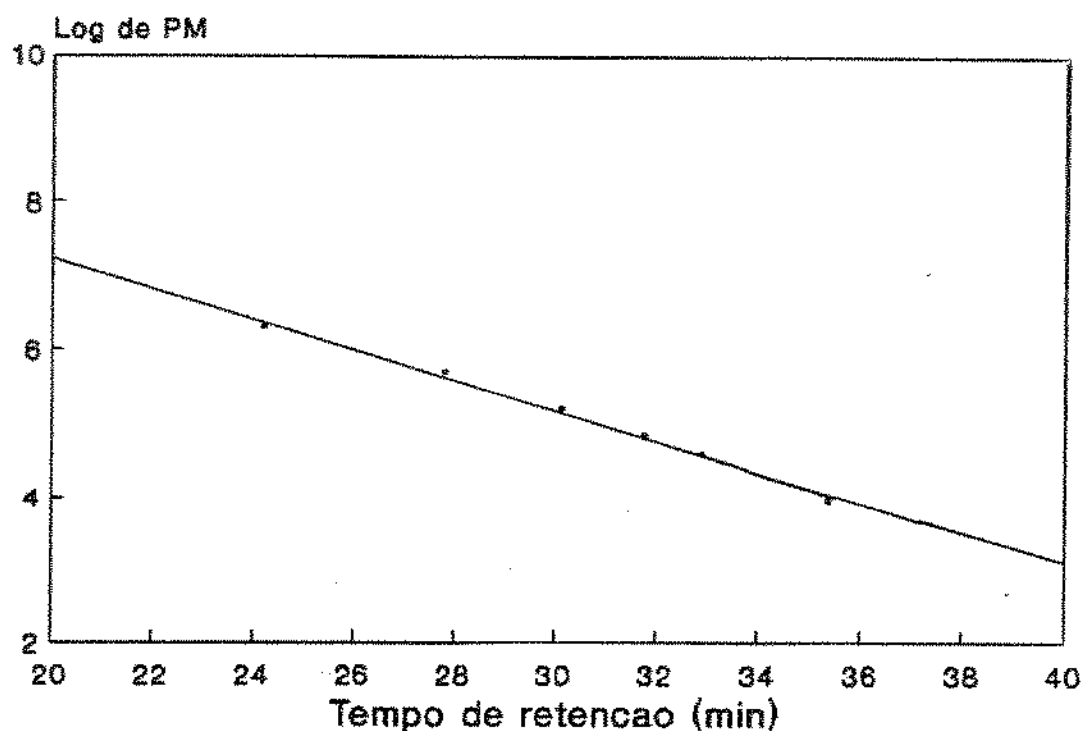


Figura 19: Curva relacionando peso molecular (PM) dos padrões e tempo de retenção (t_R) obtidos de injeções no sistema de cromatografia líquida

Dos tempos de retenção apresentados na Figura 20, observe-se por regressão linear a seguinte correlação:

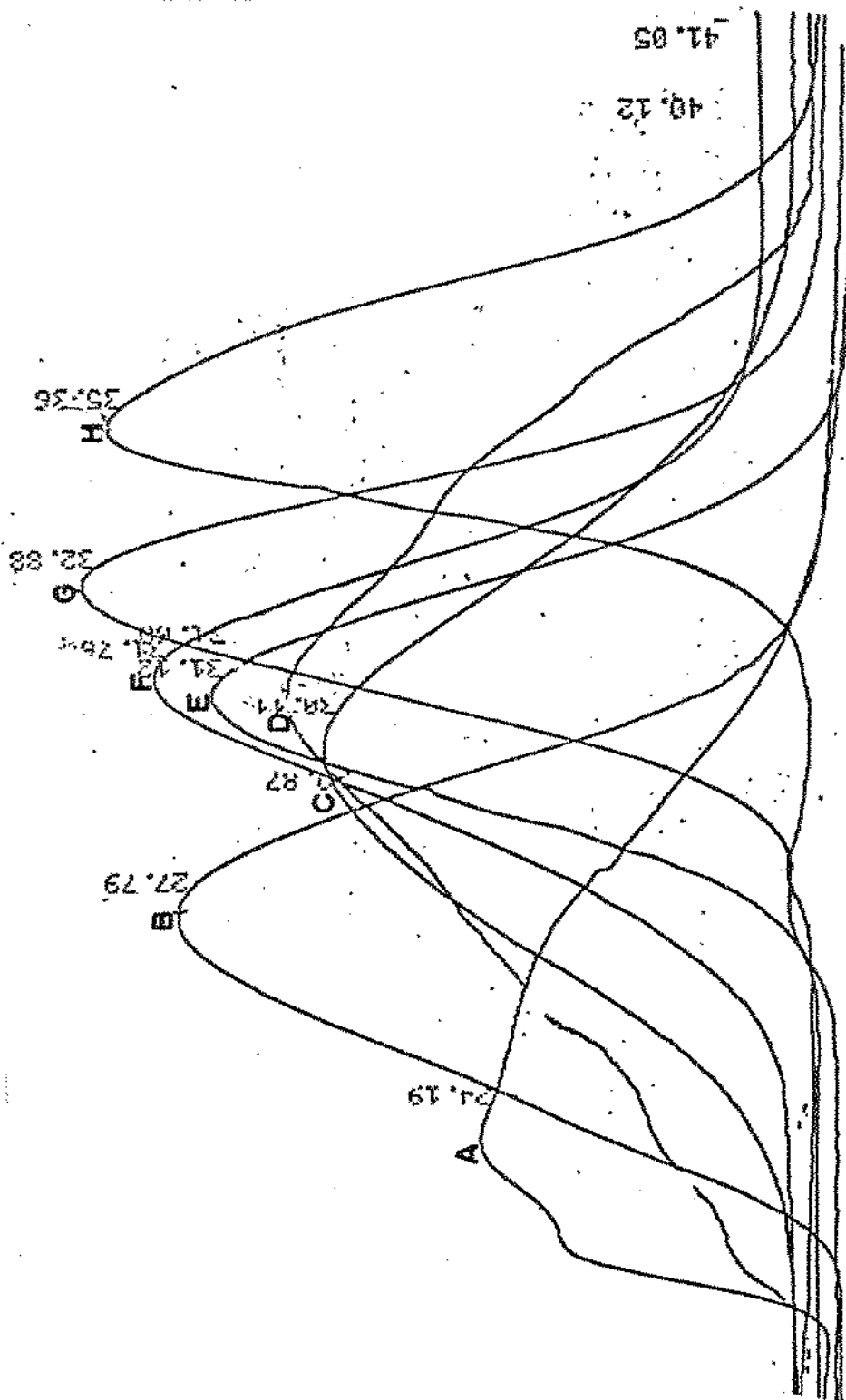


Figura 20: Cromatogramas sobrepostos dos vários padrões nas condições analíticas fixadas, onde A: padrão de $\overline{PM} = 2 \times 10^6$; B: padrão de $\overline{PM} = 5 \times 10^5$; C: padrão de $\overline{PM} = 1,6 \times 10^5$; D: solução de todos os padrões; E: padrão de $\overline{PM} = 7 \times 10^4$; F: padrão de $\overline{PM} = 6 \times 10^4$; G: padrão de $\overline{PM} = 4 \times 10^4$; H: padrão de $\overline{PM} = 9 \times 10^3$

$$\log PM = A + B * tr \quad \text{onde } A = 11,32 \text{ e } B = -0,21$$

através da qual o peso molecular médio das dextranas presentes nas amostras pôde ser estimado.

Depois de testada a eficiência das colunas disponíveis (série MicroPack TSKB 2500, 3000, 4000 e 5000 PWXL e BMPWXL) com polietileno glicol, foram injetadas soluções dos padrões em cada uma das colunas para avaliação dos tempos de retenção e, conseqüentemente, da separação obtida.

Com a utilização de apenas uma coluna, as separações não são muito eficientes, com tempos de retenção bastante próximos para os extremos de peso molecular (2×10^6 e $9,4 \times 10^3$). Há uma melhora nas colunas com limite de exclusão maiores, nas quais no entanto, não se tem boa definição dos picos nos padrões de menor peso molecular. A Tabela 11 reúne os valores obtidos de tempos de retenção dos padrões nas diferentes colunas.

Tabela 11: Tempos de retenção (minutos) dos diversos padrões nas diversas colunas

Padrões de Dextrana (Daltons)	Colunas (limite de exclusão)				
	G 2500PWXL (1×10^4)	G 3000PWXL (1×10^5)	G 4000PWXL (3×10^5)	G 5000PWXL (1×10^6)	BMPWXL (1×10^7)
$2,0 \times 10^6$	5,6	5,5	5,3	5,5	7,8
$5,0 \times 10^5$	5,6	5,5	5,5/6,8	7,5	8,0
$1,6 \times 10^5$	5,7	5,6	5,7/7,6	8,3	8,4
$4,0 \times 10^4$	5,7	6,6	6,6/8,5	7,4/9,2	8,9
$9,4 \times 10^3$	5,8	7,5	6,8/9,5	7,6/10,1	9,4

A fim de melhorar a separação, foram testadas 3 colunas em série, sendo descartada a coluna G 3000PWXL por seu limite de exclusão ser muito semelhante ao da G 4000PWXL. Os testes com as colunas 2500, 4000 e 5000 PWXL e 2500, 4000 e GMPWXL, deram ótimos resultados com injeção de uma mistura de padrões de diferentes pesos moleculares. Embora os resultados fossem bastante semelhantes, foi feita uma opção pela primeira combinação, em função de uma definição ligeiramente superior para as dextranas de baixo peso molecular e tempo de análise um pouco mais curto.

Ficaram então estabelecidos como extremos, para efeito de cálculos e avaliações, o padrão de 2×10^6 como máximo e o padrão de glicose como mínimo. É importante perceber que, para dextranas com peso molecular superior a 2×10^6 , estimativas de peso molecular médio e quantificações não devem ser feitas, pois não há precisão nessas medidas, já que esse é o limite de exclusão da coluna G 5000PWXL. No caso das dextranas de baixo peso molecular, quanto menor (próximo ao tempo de retenção da glicose) maior a imprecisão, principalmente no que se refere ao cálculo do peso molecular médio, tendo em vista que por uma limitação das colunas empregadas, monossacarídeos, dissacarídeos (sacarose, maltose) e oligossacarídeos pequenos saem no mesmo tempo de retenção do padrão de glicose, ou muito próximo a ele.

As demais condições de análise como vazão de eluente, programação do integrador e do registrador foram determinadas visando uma melhor visualização dos picos e, no caso da vazão, um compromisso entre agilidade na análise e preservação das colunas.

Nas primeiras injeções de amostras das reações de polimerização, percebeu-se interferência dos componentes do caldo fermentado, surgindo picos na região cromatográfica correspondente às dextranas de peso molecular intermediário, mostrando a necessidade de um tratamento prévio das amostras para eliminação dos interferentes.

Todos os componentes do caldo foram então injetados em concentrações próximas àquelas realmente presentes no concentrado enzimático, sendo constatado que o extrato de levedura era o único a causar problemas.

Vários testes foram feitos no sentido de purificar a amostra, tais como passagem prévia em colunas de troca iônica, precipitação das proteínas com hidróxido de bário ou ácidos fosfórico e perclórico. Dentre todas as tentativas, a que logrou melhores resultados foi a precipitação das proteínas com ácido perclórico concentrado, na concentração de 5% v/v, já que o pico a ele correspondente teve um tempo de retenção superior ao padrão de glicose injetado, não interferindo na região cromatográfica de interesse. Foi constatado no entanto, que ainda havia pequena absorção na região correspondente ao extrato de levedura, que poderia resultar em erros de quantificação. A partir disso concluiu-se que a precipitação das dextranas depois da eliminação das proteínas era indispensável, e para tanto, vários testes de precipitação de misturas de padrões com diferentes concentrações de etanol foram feitos obtendo 95% de recuperação das dextranas, com utilização de 7,5 ml de etanol 95% por ml de amostra, mantendo a amostra por

30 minutos a -4°C antes da centrifugação para efetivação da precipitação. Depois de centrifugadas as amostras foram liofilizadas e pesadas, já que com secagem em estufa houve alteração no cromatograma nos tempos de retenção correspondentes às dextranas de baixo peso molecular, provavelmente devido à hidrólise destas em presença de resíduos de ácido perclórico.

g) Estimativa das quantidades relativas das dextranas de PM baixo, intermediário e alto

O procedimento descrito a seguir foi desenvolvido para que se pudesse estimar as quantidades de dextrana nas faixas de peso molecular alto, ($\text{PM} > 2 \times 10^6$), intermediário ($2 \times 10^4 < \text{PM} < 2 \times 10^6$) e baixo ($\text{PM} < 2 \times 10^4$). A metodologia foi empregada devido à impossibilidade de utilização de outros métodos mais precisos, pela falta de equipamentos adequados.

Os cromatogramas dos padrões de vários pesos moleculares e das amostras foram exatamente sobrepostos com ajuda de cópias xerox. Numa das cópias toda região do cromatograma que apresentou picos relevantes da amostra foi recortada e pesada. Em outra das cópias, foi traçada uma reta no ponto médio (área média) do pico dos padrões, que foi utilizada como corte para o peso molecular médio equivalente. O cromatograma foi então recortado e a cada linha de corte tem-se para a esquerda dextranas de peso molecular superior àquela média e à direita inferior. As várias frações do cromatograma foram pesadas e relacionadas com a massa total do cromatograma da amostra.

A Figura 21, é útil para a visualização da metodologia empregada.

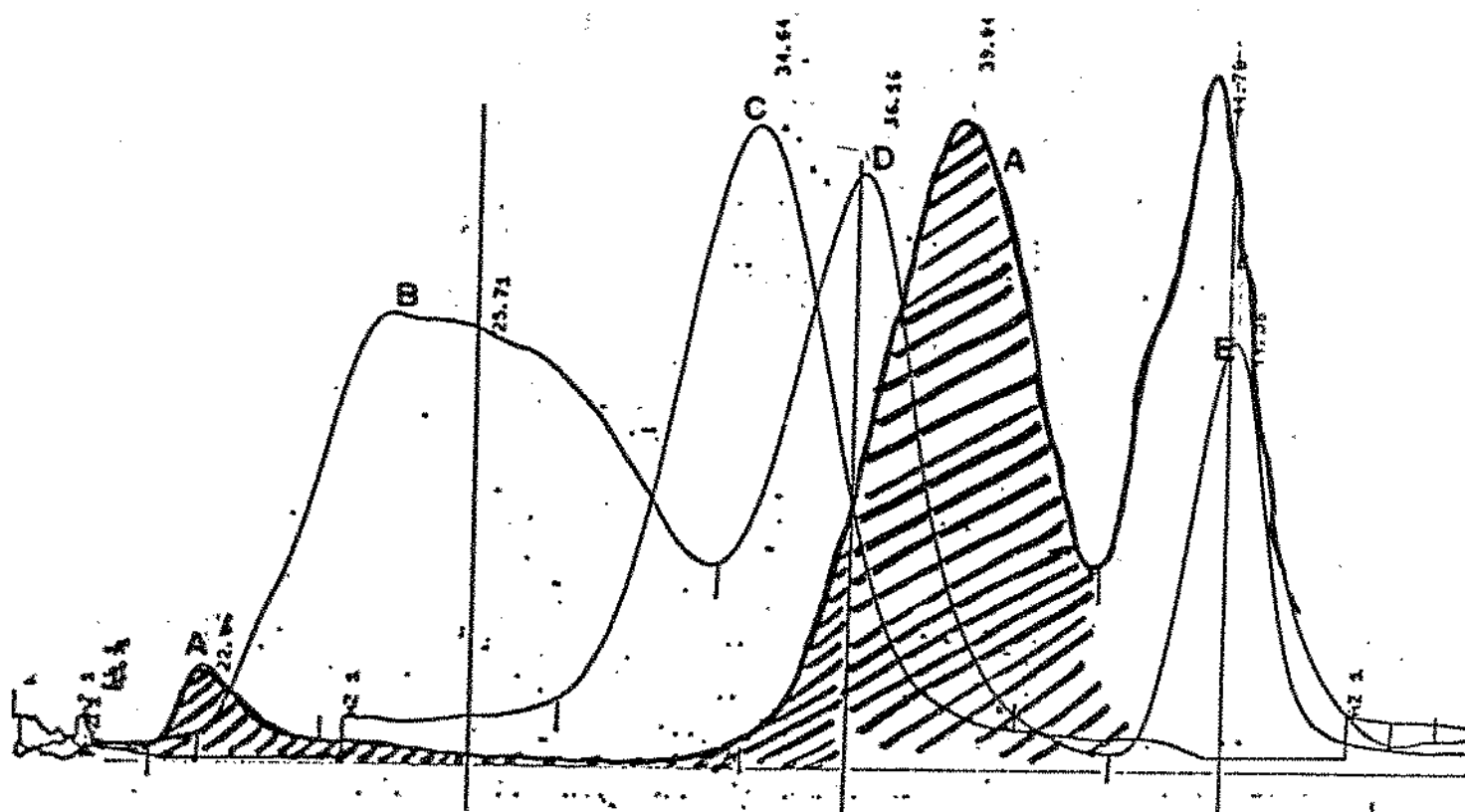


Figura 21: O cromatograma A corresponde à amostra injetada, B corresponde ao padrão de $\overline{PM} = 2 \times 10^6$; C ao padrão de $\overline{PM} = 4 \times 10^4$; D ao padrão de $\overline{PM} = 11 \times 10^3$ e E a glicose

IV. RESULTADOS E DISCUSSOES

1. FERMENTACAO

Os estudos relacionados à fermentação restringiram-se à obtenção de altas concentrações de dextrana-sacarase, levando-se em conta outras características do caldo fermentado como concentração final de açúcares redutores e dextrana que, para evitar interferências na reação de polimerização, devem ser tão baixas quanto possível.

Os ensaios em frascos agitados utilizando meio padrão, foram usados apenas na preparação do inóculo, sendo a produção da enzima feita em fermentadores em batelada simples com e sem controle de pH e em batelada alimentada.

1.1. FERMENTAÇÃO EM BATELADA

a) Fermentação sem controle de pH

As fermentações em fermentadores foram feitas usando meio padrão nas condições da literatura, ou seja, pH inicial 6,7-6,9, temperatura de 25°C, aeração de 0,5 vvm, inoculando 5% de meio incubado a 25°C por 14-16 horas. Os resultados típicos desta fase estão expostos na Figura 22. A curva de $\ln DO$ em função do tempo, indicativa do crescimento celular, mostrou uma fase de latência desprezível e uma fase exponencial de crescimento de aproximadamente 5 horas. A produção de dextrana-sacarase ocorreu de forma associada ao crescimento, como descreve LOPES (1979), obten-

do-se o máximo de produção em torno da sexta hora de fermentação, com 25 a 32 UDS/ml, começando então a declinar, coincidindo com valores baixos de pH, da ordem de 4,5, que ocasionam perda da atividade enzimática.

ROBYT & WALSETH (1979) relataram em condições semelhantes atividades da ordem de 30 UDS/ml, enquanto TSUCHIYA et al. (1952) e JEANES (1965) apontam ensaios com produção de 90-120 UDS/ml e 50-70 UDS/ml, respectivamente.

No tempo correspondente ao máximo de atividade, dosagens de açúcar redutor apresentaram valores de 2 a 3 g/l. A concentração de dextrana não foi medida, no entanto, no final da fermentação, o meio apresentava-se bastante viscoso e opalescente, características estas que comprovam a alta concentração de dextrana.

b) Fermentação com controle de pH

A partir de estudos realizados por KOEPSELL & TSUCHIYA (1952) e TSUCHIYA et al. (1952), foi constatado que a produção de dextrana-sacarase é maximizada com o controle de pH ao longo da fermentação, devendo ser mantido em torno de 6,7. Este tipo de processo vem sendo amplamente usado, apresentando pequenas alterações com relação ao agente alcalino utilizado e sua concentração.

Nos ensaios realizados foram utilizados meio padrão e as mesmas condições citadas no item anterior, fazendo o controle de pH em 6,7 pela adição de solução de NaOH 3N. Os resultados típicos estão exemplificados na Figura 23.

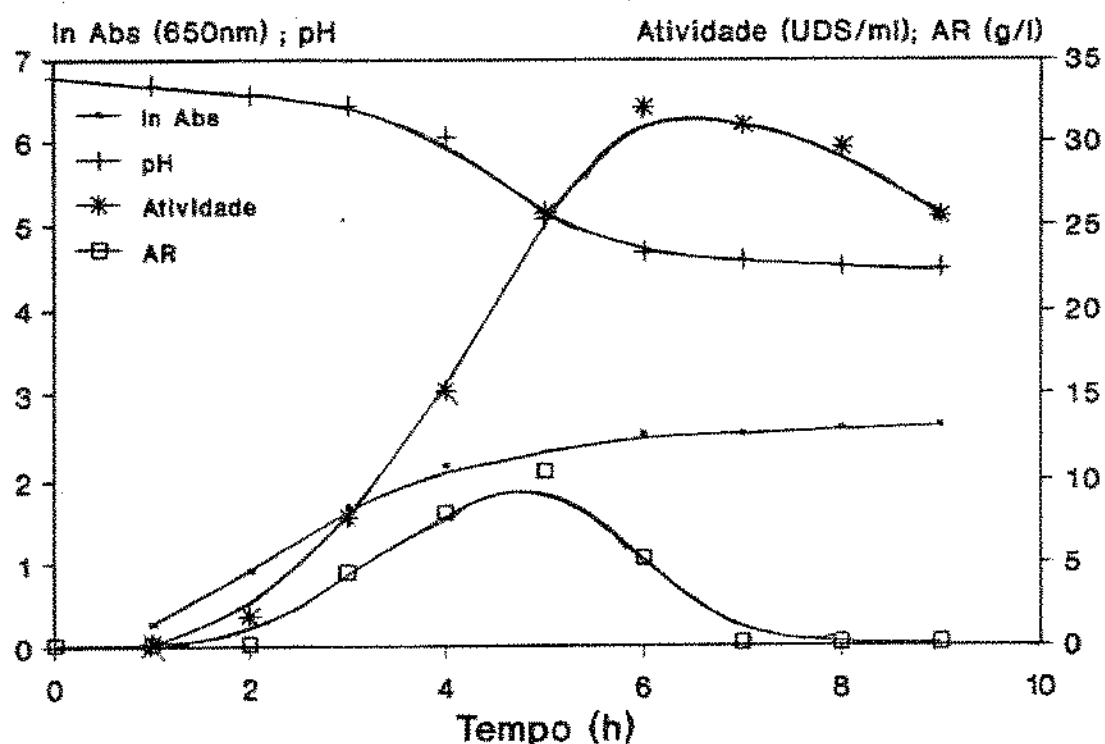


Figura 22: Variação de parâmetros de fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em meio padrão a 25°C, sem controle de pH

Observa-se que as características do crescimento celular foram praticamente iguais àquelas obtidas na fermentação sem controle de pH, sendo a fase de latência praticamente desprezível, atingindo-se depois da fase exponencial de crescimento praticamente os mesmos valores de densidade celular.

A produção de dextrana-sacarase manteve seu comportamento de associação ao crescimento, sendo alcançado um máximo de atividade entre 7 e 8 horas de fermentação, não havendo neste caso a queda brusca observada nos ensaios sem controle de pH. Os valores máximos obtidos ficaram ao redor de 50-55 UDS/ml, compatíveis com os dados da literatura onde, em condições semelhantes, a mesma

faixa de produção foi obtida por KODESELL & TSUCHIYA (1952) e TSUCHIYA et al. (1952).

Os valores de concentração de açúcares redutores e dextrana ficaram bem abaixo dos níveis encontrados anteriormente. No tempo correspondente à produção máxima, as análises indicaram concentrações de açúcares redutores e dextrana, inferiores a 1 g/l, valores estes bastante convenientes para a utilização do caldo nas reações de polimerização, pois ficam minimizadas as possibilidades de sua interferência na síntese enzimática, atuando como aceptores.

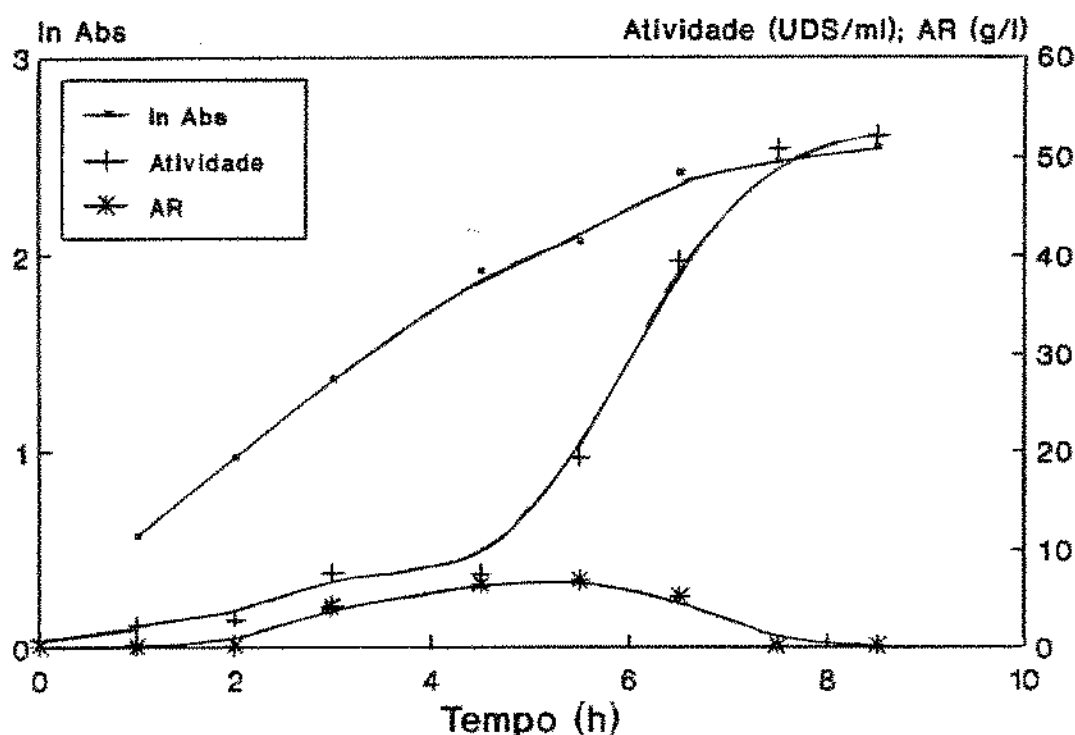


Figura 23: Variação de ln Abs, atividade enzimática, açúcares redutores durante fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em meio padrão em batelada a 25°C com pH controlado em 6,7 pela adição de solução de NaOH 3N

1.2. FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA

Uma outra alternativa para produção de dextrana-sacarase em níveis mais elevados é fazer, além do controle do pH durante a fermentação, a alimentação de sacarose para manutenção de uma concentração ótima, onde a produção de enzima seja maximizada e a de dextrana minimizada.

A literatura cita várias formas de adição de sacarose, como alimentação contínua (MARTINES-ESPINDOLA & LOPES-MUNGUÍA (1985)) ao longo de toda fermentação, durante fase exponencial de crescimento (MONSAN & LOPEZ (1981 a e b) e PRAT et al. (1987)), alimentação de quantidades crescentes de açúcares (SABATIE et al. (1986)) ou ainda alimentação até a metade da fase exponencial com controle do pH, seguido de uma fase sem controle e sem adição, até o final da fermentação (QUEIROZ & MAUGERI (1989)). Em todos estes casos altas concentrações de enzima foram obtidas.

MONSAN & LOPEZ (1981a) relataram uma forma de alimentação de sacarose associada ao controle de pH, fazendo adição de solução alcalina de sacarose, sendo assim a demanda de sacarose associada ao crescimento e à queda do pH mais adequadamente suprida.

Nos trabalhos realizados, as condições utilizadas foram as mesmas usadas por MONSAN & LOPEZ (1981a), ou seja, meio padrão com redução da concentração inicial de sacarose para 20 g/l e adição de solução alcalina de sacarose (NaOH 3N e sacarose 600 g/l) acionada pelo sistema controlador de pH.

Através da figura 24 pode-se perceber que em termos de crescimento celular e produção, houve o mesmo comportamento ante-

riormente observado, tendo sido atingidos valores mais altos em termos de concentração celular, com 4,7-5,0 g de células secas/l, equivalente a um aumento de quase 50% no crescimento. Quanto à atividade enzimática, houve um aumento de quase 3 vezes em relação à batelada simples, sendo obtidos valores da ordem de 150 UDS/ml, com adição de aproximadamente 200 g de sacarose durante a fermentação.

Apesar da elevada atividade no caldo, as concentrações de açúcares redutores (17 g/l) e dextrana (5 g/l) inviabilizam sua utilização nos estudos pretendidos, pois uma redução no peso molecular das dextranas obtidas poderia ser devido à presença de frutose e dextrana atuando como aceptores.

Das características dos concentrados enzimáticos obtidos (Tabela 12), optou-se pelo processo de produção de dextrana-sacarase em batelada simples com controle de pH.

Tabela 12: Características do caldo fermentado no tempo correspondente ao máximo de produção, nos diferentes processos testados

Processo	Atividade (UDS/ml)	[Açúcar redutor] (g/l)	[Dextrana] (g/l)
Batelada	30	3	-
Batelada c/controle de pH	50	<1	<1
Batelada alimentada	150	17	5

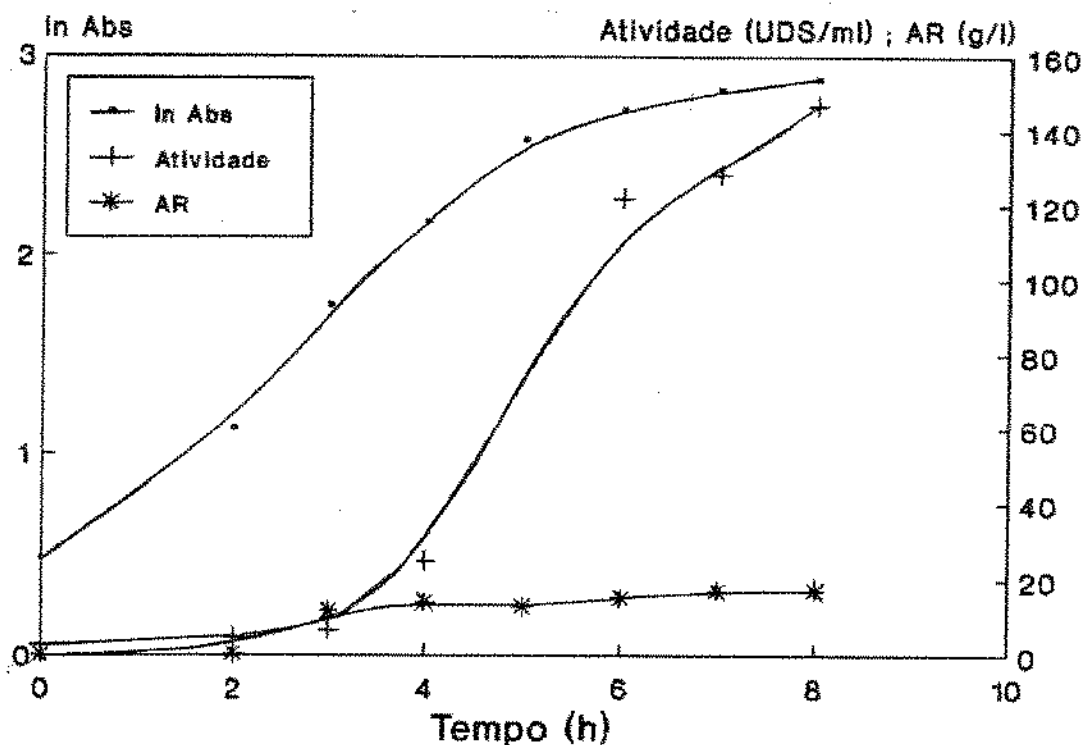


Figura 24: Variação de ln Abs, atividade enzimática, açúcares redutores durante fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em meio contendo 20 g/l de sacarose a 25°C com ali-
mentação de solução contendo sacarose 600 g/l e NaOH 3N

2. REACAO ENZIMATICA

Na intenção de obter dextranas de baixo peso molecular (2.500-7.500) para produção de ferro-dextrana, sem necessidade da etapa hidrolítica para redução do peso molecular do biopolímero obtido nas condições usuais de processo (ALSOP (1983), WOLFF et al. (1954) e ZIEF et al (1956)), foram feitos estudos usando vá-
várias concentrações de sacarose e maltose para avaliação das ca-
racterísticas dos polissacarídeos formados.

Nos testes realizados foi utilizado o concentrado enzimático bruto, sem qualquer etapa de purificação, a não ser a eliminação das células bacterianas e acerto do pH para 5,2, ótimo para atuação da dextrana-sacarase. Em ensaios preliminares, percebeu-se que o pH não sofre alteração significativa durante a reação, não havendo necessidade da utilização de solução tampão, embora o uso de tampão citrato (MONSAN & LOPEZ (1981) e acetato (BRASWELL et al. (1962)) tenham sido relatados em trabalhos de estudo da reação enzimática.

A partir de dados da literatura consultada, a temperatura de 25°C foi estabelecida para a condução dos ensaios por conferir boa estabilidade à enzima e velocidade de reação adequada às avaliações pretendidas.

A atividade enzimática utilizada (30 UDS/ml) foi determinada através de ensaios preliminares, onde as atividades de 20, 30 e 40 UDS/ml foram testadas nas condições estabelecidas de temperatura, pH, e concentração inicial de sacarose, de 100 g/l.

Com a utilização de 20 UDS/ml percebeu-se que para concentrações elevadas de sacarose (400 e 500 g/l), a reação seria muito demorada, dificultando a amostragem e favorecendo contaminações que poderiam interferir na avaliação dos resultados.

Por outro lado, o emprego de atividade de 40 UDS/ml acarretaria reações extremamente rápidas, principalmente para concentrações iniciais de sacarose baixas (50 e 100 g/l), prejudicando a avaliação dos resultados no início da síntese.

2.1. ASPECTOS CINÉTICOS

Durante as reações, na presença ou não de maltose foram retiradas amostras em intervalos regulares de tempo mais ou menos espaçados, de acordo com a velocidade de formação de frutose no meio, para dosagem das concentrações de açúcares redutores pelo método de DNS, além da avaliação da evolução do peso molecular ao longo da síntese.

Embora o objetivo principal deste trabalho seja a análise qualitativa e semi-quantitativa das dextranas quanto a peso molecular, algumas considerações quanto ao comportamento cinético da reação nas diferentes concentrações de sacarose e acceptor não devem ser desprezadas (embora os valores numéricos não tenham a precisão desejada), pois dão boas indicações da atuação da dextrana-sacarase.

É interessante notar a influência do aumento das concentrações iniciais de sacarose e maltose, nas velocidades iniciais de reação, calculadas para o início do processo, quando a concentração de frutose no meio não deve alterar significativamente o andamento da reação, o que se discutirá a seguir.

2.1.1. Influência da concentração de sacarose

Observa-se nos experimentos que o aumento da concentração inicial de sacarose de 50 para 500 g/l influe na evolução de açúcares redutores que se constituem fundamentalmente de frutose, como mostra o gráfico da Figura 25. Como esperado, a formação de frutose se torna cada vez mais lenta, já que além da inibição por

substrato relatada a partir de 70 g/l por HEHRE (1941), o aumento da concentração de frutose tende a diminuir a velocidade da reação, como constatado por KOEPSELL et al. (1952).

A Tabela 13, contém os dados obtidos de dosagem de açúcar redutor pelo método DNS ao longo do tempo, nas várias concentrações iniciais de sacarose estudadas. Estes dados estão plotados na Figura 25.

Tabela 13: Evolução de açúcares redutores (AR) ao longo do tempo para várias concentrações iniciais de sacarose

[So] (g/l)											
50	tempo (h)	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0			
	[AR] (g/l)	3,0	12,6	17,1	22,2	22,6	22,8	22,3			
100	tempo (h)	0	0,5	1,2	1,8	2,2	3,2	3,7			
	[AR] (g/l)	2,4	12,4	20,8	26,8	31,9	39,1	40,3			
200	tempo (h)	0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	
	[AR] (g/l)	1,7	9,2	20,6	37,0	48,7	56,9	71,7	72,5	76,5	
300	tempo (h)	0	0,75	1,75	2,75	3,75	4,75	6,25	7,25	8,25	9,25
	[AR] (g/l)	1,9	7,0	16,7	24,1	35,3	50,6	70,5	79,0	84,4	98,3
400	tempo (h)	0	1,0	2,0	4,0	5,5	7,5	9,5	11,5	13,5	
	[AR] (g/l)	1,4	7,9	16,1	34,6	48,6	75,4	91,1	136,1	148,5	
500	tempo (h)	0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,5	22,5	24,5	
	[AR] (g/l)	2,4	20,2	41,6	71,0	121,9	152,5	185,1	215,6	207,9	

Como citado anteriormente, foram calculadas velocidades iniciais, utilizando tempos que correspondem a concentrações de AR tão baixas quanto possível. Os cálculos foram feitos por regressão linear, obtendo para os pontos utilizados bons valores de coeficiente de correlação.

Através de análise dos dados plotados na Figura 26, pode-se confirmar a inibição por substrato em torno da concentração de 100 g/l, como previsto pela literatura, havendo a partir deste ponto uma queda abrupta na velocidade até 300 g/l, quando um descréscimo menor é observado. Um novo salto no valor da velocidade ocorre entre 400 e 500 g/l não sendo encontrado na literatura nenhuma referência a esse respeito, já que na maioria dos estudos cinéticos encontrados as concentrações de sacarose utilizadas não ultrapassam 350 g/l.

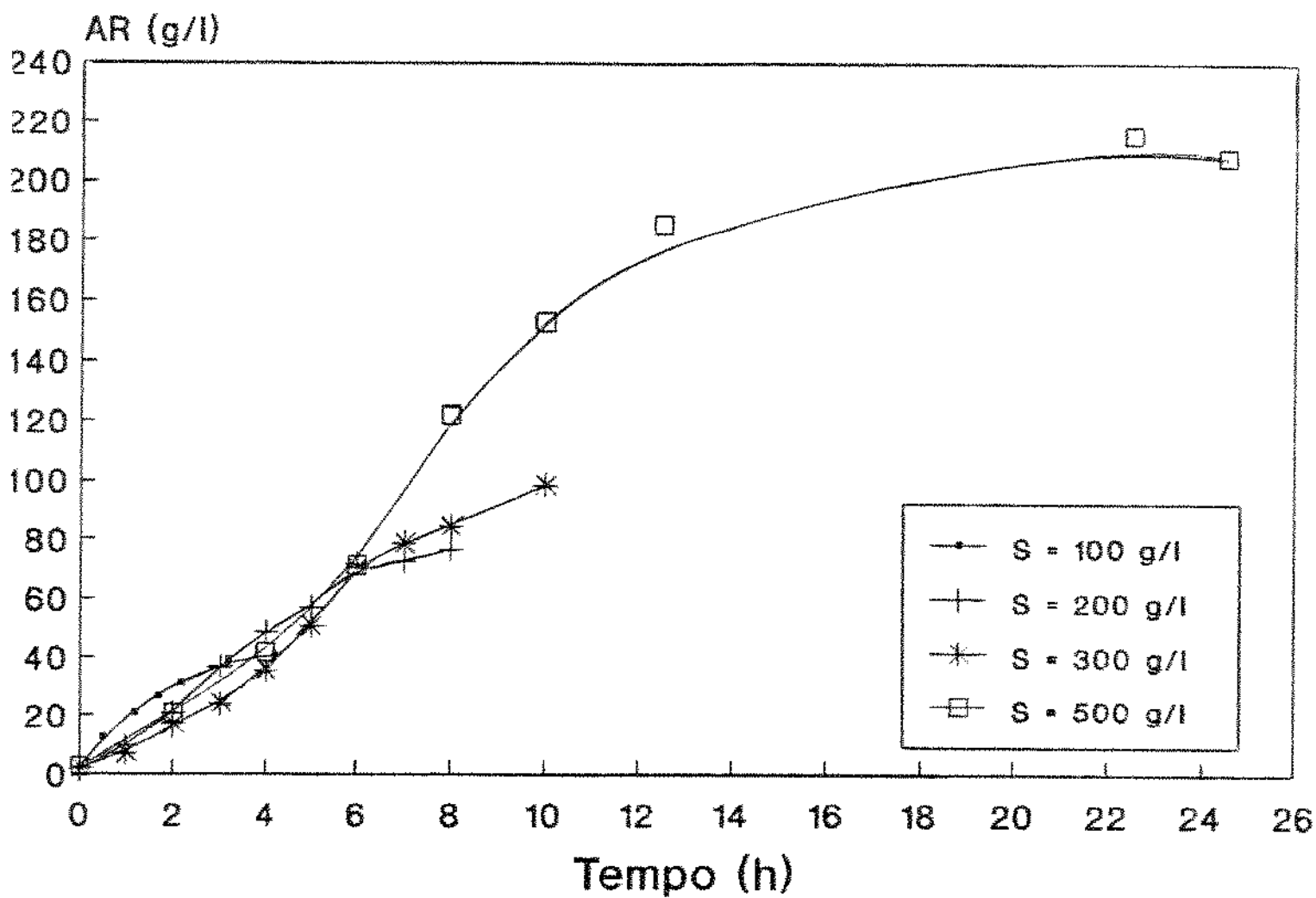


Figura 25: Evolução de frutose ao longo da síntese enzimática com concentrações iniciais de sacarose de 100, 200, 300 e 500 g/l, a 25°C e 30 UDS/ml

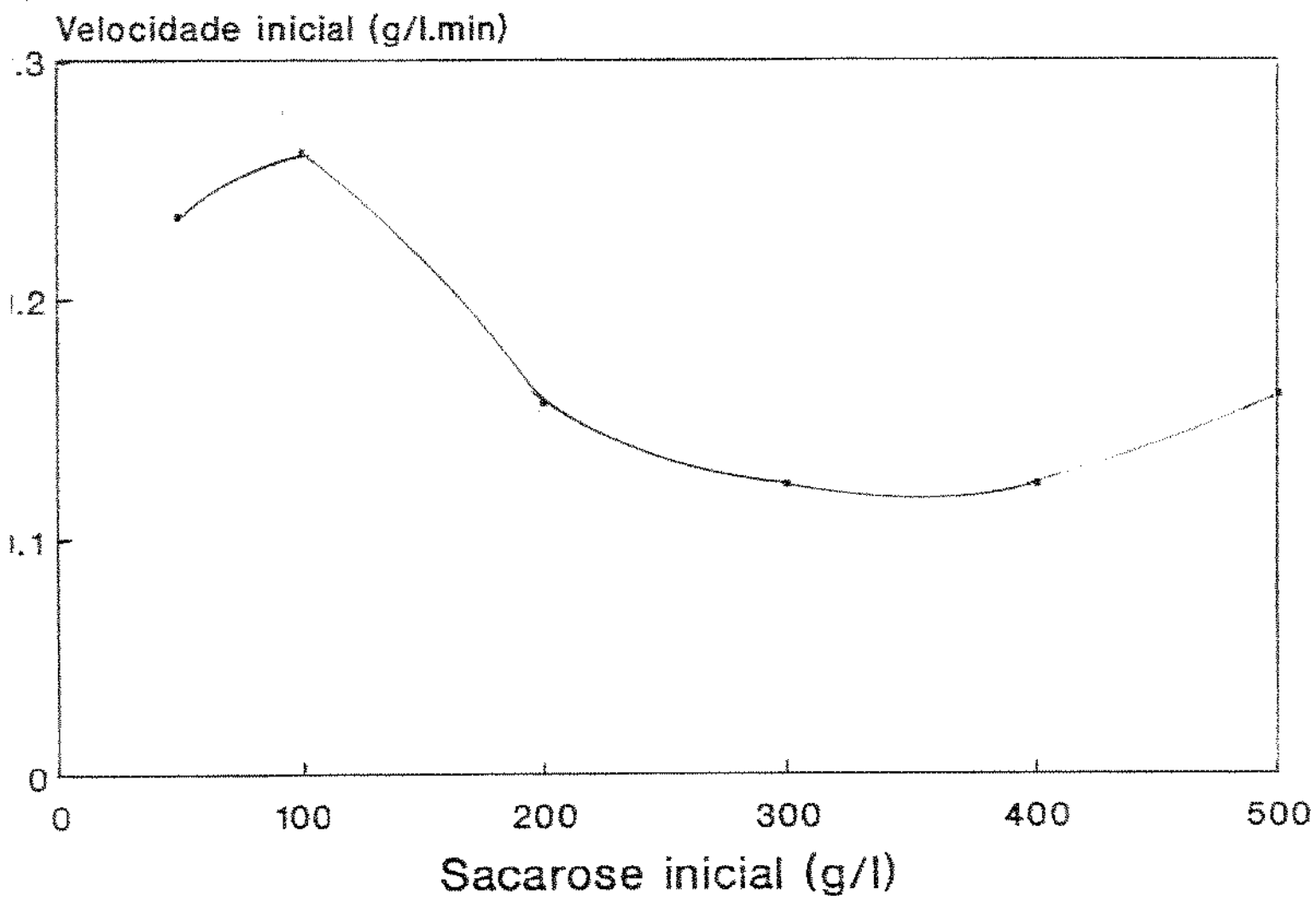


Figura 26: Velocidades iniciais de reação (v_i) versus concentração inicial de sacarose (S_0) a 25°C e 30 UDS/ml

2.1.2. Influência da concentração de maltose

A exemplo dos testes feitos apenas com o uso de sacarose, os mesmos estudos foram realizados para concentrações de 0,5; 1,0 e 2% de maltose em relação a concentrações de sacarose de 100, 200 e 300 g/l, mantendo assim para cada valor de sacarose três razões [maltose]/[sacarose] fixas e iguais a 0,005, 0,01 e 0,02. Esses valores foram selecionados a partir da literatura consultada, destacando-se um trabalho de PAUL et al. (1986), que define um comportamento linear do peso molecular da dextrana formada, com a razão [sacarose]/[maltose] dada pela equação:

$$\overline{PM} = 340 (1 + 0,48[S]/[M])$$

onde $\overline{PM}$ = peso molecular médio de dextrana

[S] = concentração de sacarose

[M] = concentração de maltose

Como descrito em trabalhos anteriores, foi verificado o aumento na velocidade inicial de reação com o uso de maltose como acceptor, e com o aumento de R (razão [M]/[S]).

As Tabelas 14, 15 e 16 mostram os dados obtidos nas análises de açúcar redutor com o avanço da reação. Pode-se perceber o aumento da velocidade inicial com o aumento de R para cada S_0 . Como anteriormente, calculou-se por regressão linear as velocidades iniciais, cujos valores estão representados na Figura 27 em função de S_0 e diferentes valores de R testados, sendo incluídos aqui os dados obtidos sem a utilização de maltose (R=0). Dos perfis apre-

Tabela 14: Concentração de açúcares redutores ao longo do tempo para reações com $[S_0] = 100 \text{ g/l}$ em vários valores de R

R=[M]/[S]	[So] = 100 g/l									
0,02	tempo (h)	0	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0		
	[AR] (g/l)	5,0	13,9	23,9	26,4	35,7	43,0	42,8		
0,01	tempo (h)	0	0,3	0,7	1,0	1,3	1,7	2,0	2,7	3,0
	[AR] (g/l)	4,3	10,7	16,3	21,4	25,1	30,5	34,3	37,4	36,5
0,005	tempo (h)	0	0,3	0,7	1,0	1,3	1,7	2,0	2,8	3,2
	[AR] (g/l)	4,5	10,4	16,7	21,5	25,8	29,6	38,1	42,7	42,4

Tabela 15: Concentração de açúcares redutores para $[S_0] = 200 \text{ g/l}$ em vários valores de R

R=[M]/[S]	[S ₀] = 200 g/l										
	tempo (h)	0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0		
0,02	[AR] (g/l)	4,0	21,7	40,3	53,9	61,3	69,5	69,0	72,1		
0,01	tempo (h)	0	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,5
	[AR] (g/l)	3,2	9,5	14,5	22,1	30,3	45,3	56,9	66,0	70,8	68,7
0,005	tempo (h)	0	0,5	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,5	
	[AR] (g/l)	2,0	7,7	18,0	25,1	36,8	44,7	57,8	63,7	65,2	

Tabela 16: Concentração de açúcares redutores para $[S_0] = 300 \text{ g/l}$ em vários valores de R :

R=[M]/[S]	[S ₀] = 300 g/l										
	tempo (h)	0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,3
0,02	[AR] (g/l)	3,9	13,9	24,5	30,5	43	54,5	62,7	82,5	83,2	79,8
0,01	tempo (h)	0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,5
	[AR] (g/l)	2,6	11,0	20,2	33,9	41,8	54,9	64,2	73,0	75,1	79,4
0,005	tempo (h)	0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,5	8,5	9,5
	[AR] (g/l)	3,0	11,5	19,6	31,2	40,8	50,8	65,3	98,2	95,8	85,8

sentados é nítido o efeito da maltose no aumento da velocidade de reação em todas as concentrações de maltose, sendo tanto maior quanto maior a concentração de maltose usada. A atuação da maltose na aparente diminuição do efeito da inibição pelo substrato fica evidenciada na curva correspondente a $R = 0,02$, onde somente a partir de 200 g/l começa a surgir a inibição, diferente do que acontece na ausência de maltose ($R = 0$) quando o efeito inibitório surge já com 100 g/l. Aparentemente, o mesmo acontece em valores de R mais baixos, 0,01 e 0,005, onde há inibição a partir de 100 g/l de sacarose.

O aumento na velocidade de reação e conseqüentemente da velocidade máxima de reação ($v_{\max}$) está de acordo com os estudos anteriores, realizados por PAUL et al. (1986), onde o aumento dos valores de ($v_{\max}$) e (k_m) para a dextrana-sacarase em concentrações crescentes de maltose, é verificado experimentalmente. Estes efeitos podem ser explicados de acordo com o mecanismo de ação da dex-

trana-sacarase apresentado por EBERT & SCHENK (1968), segundo o qual a transferência da cadeia em crescimento para o resíduo glicosídico é a etapa limitante do processo pelo impedimento estérico apresentado pela molécula de dextrana de alto peso molecular. Na presença de maltose, o resíduo glicosídico é rapidamente capturado pelo acceptor antes da sua ligação à cadeia, eliminando essa etapa limitante. O desprendimento dos oligossacarídeos do sítio ativo da enzima e a mudança no destino dos resíduos glicosídicos acelera a reação e requer maior concentração de substrato para atingir a saturação da enzima.

STRINGER & TSUCHIYA (1958) utilizando α -metil glicosídeo, também considerado um "acceptor" bastante eficiente, constataram também o aumento tanto em (v_{max}) como em (km), embora não tão acentuado quanto no caso da maltose.

Velocidade inicial (g/l.min)

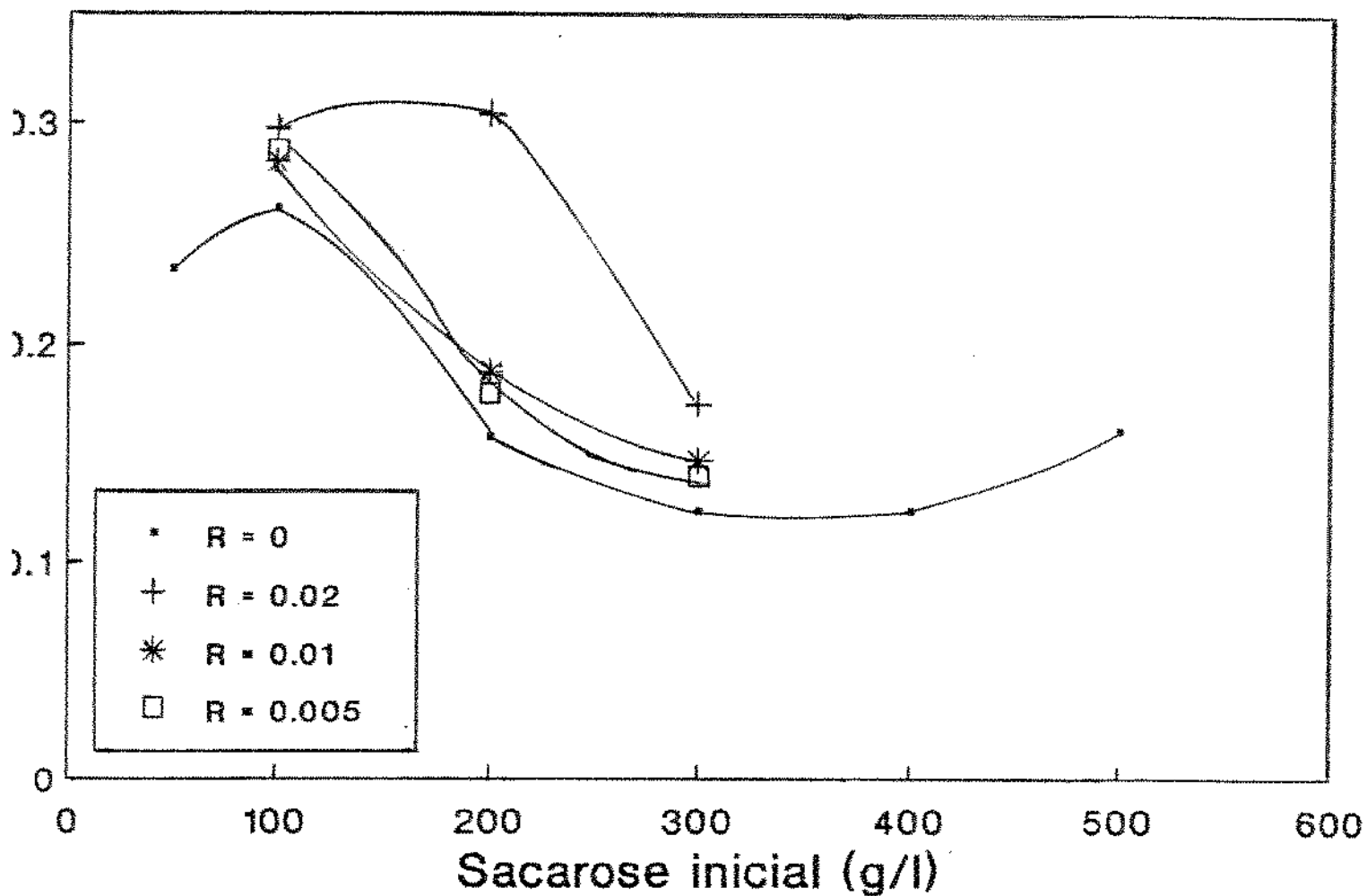


Figura 27: Velocidade inicial (v_i) versus concentração inicial de sacarose (S_0), para vários valores de R , a 25°C e 30 UDS/ml

2.2. OBTENÇÃO DE DEXTRANA DE BAIXO PESO MOLECULAR

Neste item serão apresentados resultados de composição da massa reacional em termos de peso molecular de dextrana, durante a síntese e uma avaliação quali e quantitativa do polissacarídeo obtido no final do processo, nas diversas condições testadas.

Além de sua eficiência como acceptor, a maltose foi escolhida em função do número de informações disponíveis na literatura e de pesquisas mercadológicas realizadas (CURRALERO et al. (1991), que indicam sua fácil aquisição no mercado interno, tendo ainda sido detectado um produto em fase de produção experimental pela Refinações de Milho Brasil, denominado HMS (High Maltose Sirup) com alta concentração de maltose com preço bastante acessível, cuja eficiência poderia ser estudada.

2.2.1. Reações com uso exclusivo de sacarose

Na descrição dos resultados a seguir, as dextranas obtidas serão classificadas quanto ao peso molecular, por comparação do tempo de retenção das amostras com os dos padrões injetados, sendo divididas em três faixas:

- Peso molecular alto: dextranas com peso molecular superior a 2×10^6 .
- Peso molecular intermediário: dextranas com peso molecular entre 2×10^6 e 4×10^4 .
- Peso molecular baixo: dextranas com peso molecular inferior a 4×10^4 até aquele correspondente ao do padrão de glicose, em cujo tempo de retenção saem sem separação pequenos oligossacarídeos.

a. Variação de peso molecular ao longo da reação

Nas reações com concentração mais baixa de sacarose (50 e 100 g/l), não há alteração significativa da distribuição de peso molecular ao longo da síntese como previsto por BRASWELL & STERN (1959) em seus estudos com enzima bruta. Em ambos os casos, na primeira amostra retirada depois de 30 minutos de síntese, observa-se no cromatograma um único pico bem definido, com tempo de retenção inferior ao do padrão de 2×10^6 , sinalizando para a formação de dextranas de peso molecular superior a este. Para tempos de retenção maiores não existem picos definidos (a não ser aquele correspondente à glicose), aparecendo em toda faixa uma grande dispersão, o que demonstra que não houve formação considerável de dextranas com um peso molecular médio específico. Este mesmo com-

portamento se manteve até o final da tomada de dados.

A Tabela 17 traz as quantidades das dextranas de peso molecular alto, intermediário e baixo em relação às dextranas totais, durante a reação.

O cromatograma da Figura 28 ilustra a distribuição de pesos moleculares obtida na concentração de 100 g/l.

Tabela 17: Proporção das espécies moleculares ao longo da reação para $[S_0] = 50$ e 100 g/l

Tempo(h)	$[S_0] = 50 \text{ g/l}$			$[S_0] = 100 \text{ g/l}$		
	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)
0,5	70	17	13	69	14	18
1,0	62	23	15	69	21	10
1,5	66	21	13	72	15	13
2,0	60	29	11	70	21	9
3,0	67	23	10	65	19	16

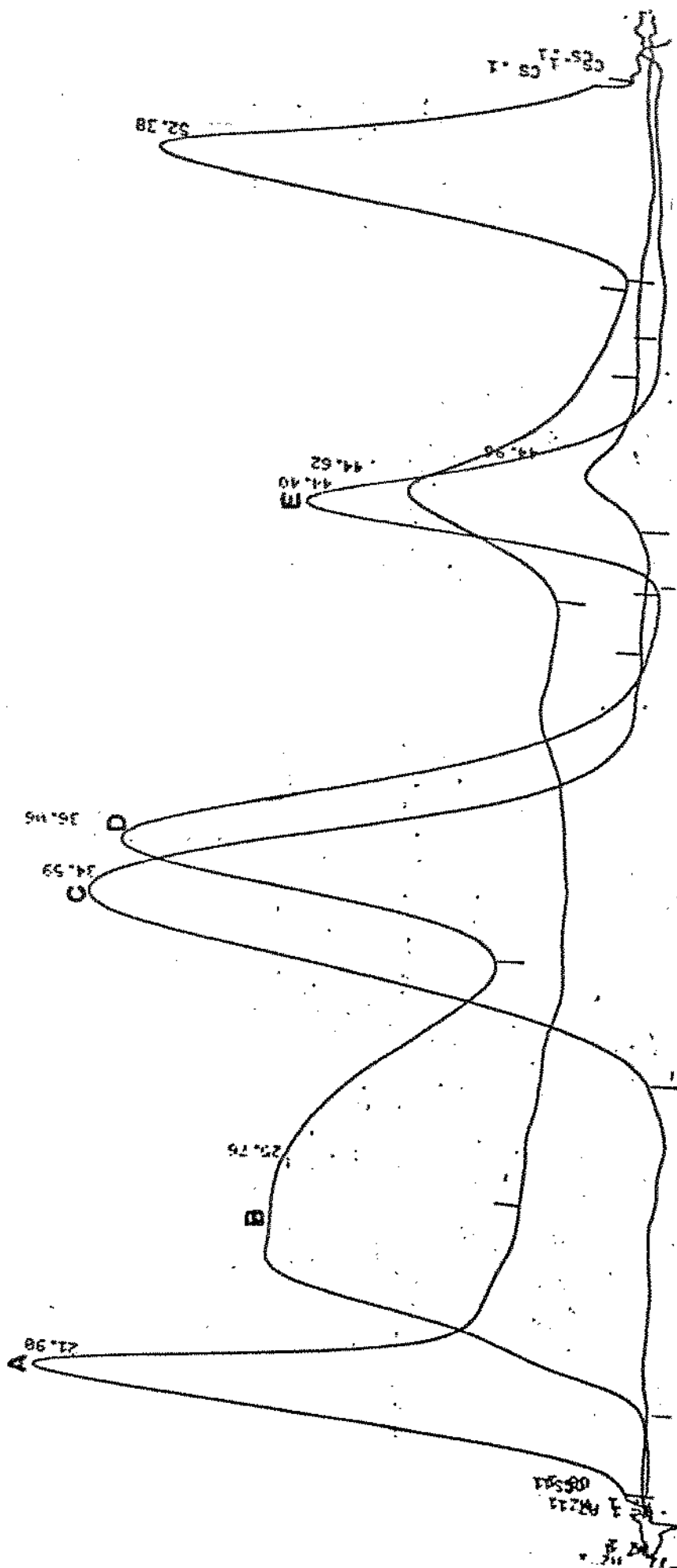


Figura 28: Cromatograma obtido ao final da síntese enzimática a 25°C, 30

UD/ml e concentração inicial de sacarose de 100 g/l. O cromatograma da amostra final (3 h) é representado pela letra A; B

é o padrão de $\overline{FM} = 2 \times 10^6$; C o de $\overline{FM} = 4 \times 10^4$; D o de $\overline{FM} = 10^3$ e

E o padrão de glicose

Com o aumento da concentração para 200 g/l como verifica do anteriormente (ALSOP (1983), BRASWELL & STERN (1959) e TSUCHIYA et al. (1955)), a distribuição bimodal de peso molecular começa a aparecer, ou seja, além do pico correspondente à dextrana de alto peso molecular, um outro com maior tempo de retenção aparece, mostrando que as dextranas formadas se polarizam em dois pesos moleculares bem distintos. O surgimento da dextrana com peso molecular de aproximadamente 4.000 daltons não ocorre logo no início do processo. No final da primeira hora de reação existem essencialmente dextranas de alto peso molecular como pode ser constatado na Figura 29, quando a concentração de frutose no meio reacional é inferior a 1% e seu efeito como acceptor ainda não se faz sentir. Com o decorrer da reação percebe-se que na 2^a hora o pico correspondente à dextrana de baixo peso começa a se delinear, quando a frutose atinge aproximadamente 2%. Este valor é inferior àquele citado por BRASWELL & STERN (1959) que estabeleceram o valor de 5% para o início do aparecimento do comportamento bimodal, assim como TSUCHIYA et al. (1955). Isto pode ser explicado pelas diferentes metodologias analíticas empregadas para o estabelecimento destes valores. BRASWELL & STERN utilizaram a viscosidade intrínseca e TSUCHIYA a precipitação com etanol para detecção do surgimento da dextrana de baixo peso, métodos estes bem menos sensíveis que a permeação em gel por HPLC, utilizada neste trabalho.

Assim, a concentração da dextrana de baixo peso vai aumentando ao longo do tempo, tornando-se no entanto mais dispersa (Figuras 30 e 31).

Tabela 18: Composição relativa da massa reacional ao longo do tempo para $[S_0] = 200 \text{ g/l}$

Tempo (h)	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)
1,0	70	24	6
2,0	52	23	25
3,0	59	20	21
4,0	57	8	35
5,0	40	14	46
6,0	35	13	52
8,0	45	15	40

Na faixa intermediária praticamente não houve variação na relação desta com as demais, parecendo ter havido um ligeiro decréscimo de 20 para 15% em relação ao total, como ilustra a Tabela 18.

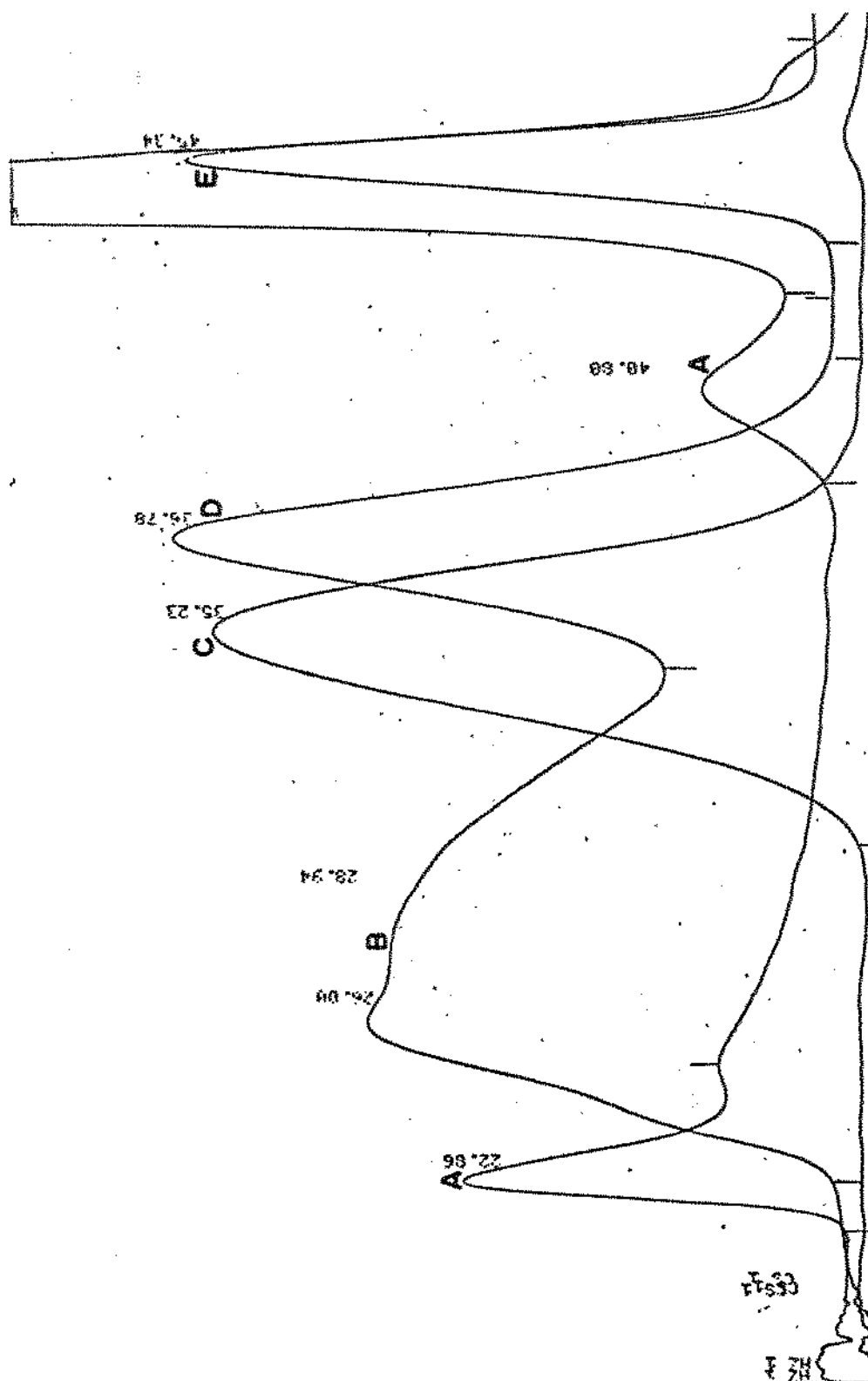


Figura 30: Cromatograma obtido de injeção de meio reacional depois de 2

horas de síntese a 25°C, 30 UDS/ml e 200 g/l de sacarose ini-

cial. A é o cromatograma da amostra; B do padrão de $\overline{PM}=2 \times 10^6$;

C de $\overline{PM} = 4 \times 10^4$; D de $\overline{PM} = 11 \times 10^3$ e E do padrão de glicose

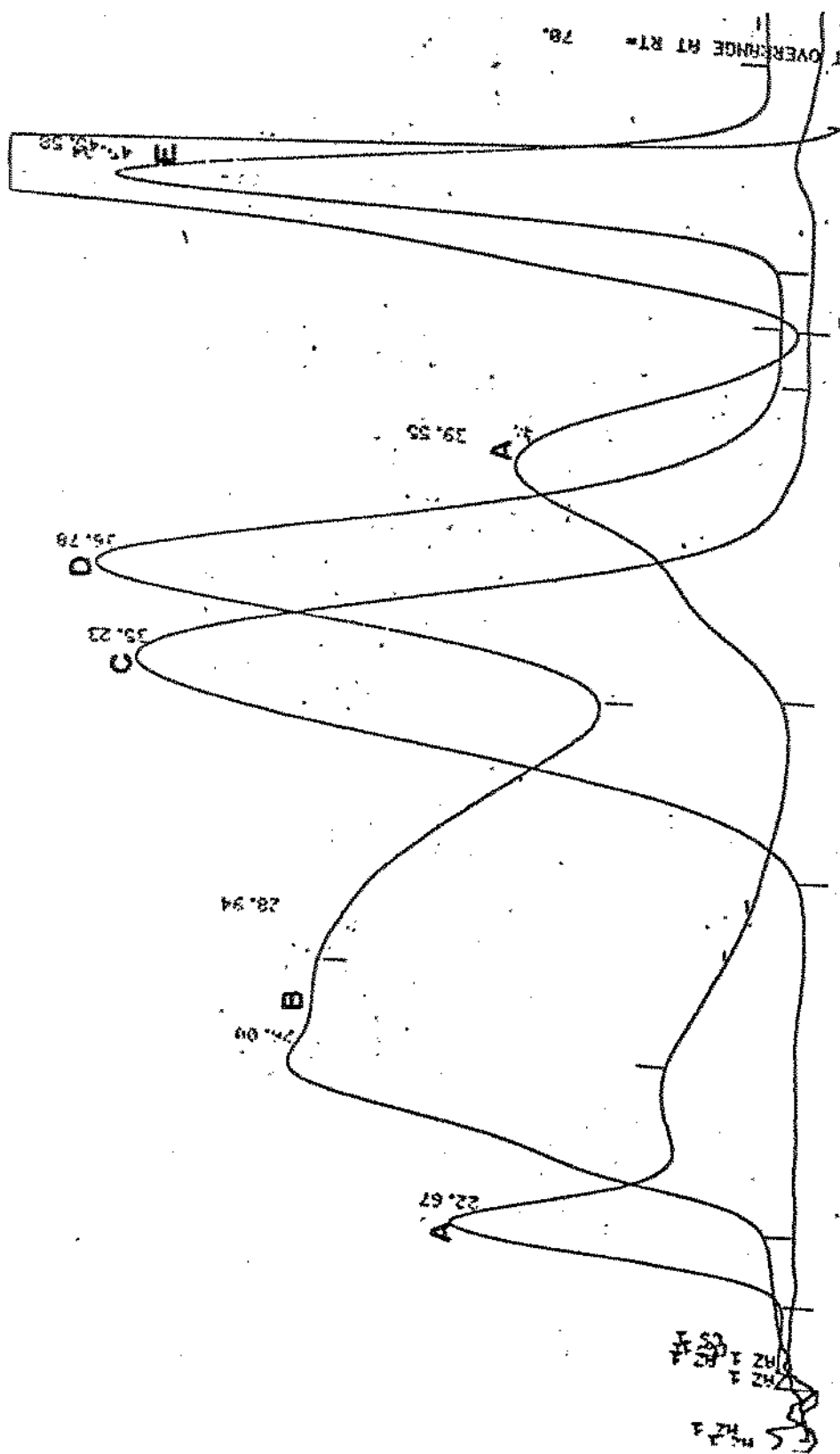


Figura 31: Cromatograma obtido de injeção de meio reacional depois de 6 horas de síntese a 25°C, 30 UDS/ml e 200 g/l de sacarose inicial. A é o cromatograma da amostra; B do padrão de $\overline{PM}=2 \times 10^6$; C de $\overline{PM} = 4 \times 10^4$; D de $\overline{PM} = 11 \times 10^3$ e E do padrão de glicose

Para concentração de 300 g/l, o comportamento em relação à variação no peso molecular foi bastante semelhante ao obtido para 200 g/l, surgindo na primeira hora somente a dextrana nativa e a partir daí começando a surgir as dextranas com peso molecular também em torno de 4.000 daltons, sendo aparentemente menos dispersa neste caso. Pode ser notado que a síntese ficou ainda mais direcionada para espécies de baixo peso molecular. A Tabela 19 traz a evolução na composição do meio ao longo do tempo.

Tabela 19: Composição relativa da massa reacional ao longo do tempo para $[S_0] = 300 \text{ g/l}$

Tempo (h)	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)
1,0	63	27	10
3,0	66	18	16
4,0	48	19	33
5,0	40	13	47
6,0	28	17	55
7,0	25	21	54
10,0	26	21	53

Aumentando ainda mais a concentração de sacarose para 400 e 500 g/l (Tabelas 20 e 21) nenhuma mudança significativa é notada em relação à distribuição de peso molecular. Apesar do peso molecular médio da dextrana de baixo peso também não se alterar ficando em torno de 4.000 daltons, a dispersão parece diminuir com o aumento da concentração, aparecendo picos mais agudos e de forma gaussiana, mais próximos de um padrão monodisperso.

Seguindo a mesma tendência observada até aqui o aumento na produção das dextranas de baixo peso em relação às outras vai se tornando maior, obtendo-se no final da reação (24 horas) com

500 g/l de sacarose, 80% das dextranas totais presentes na massa reacional correspondendo àquelas de baixo PM.

Tabela 20: Composição relativa da massa reacional ao longo do tempo para $[S_0] = 400$ g/l

Tempo (h)	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)
1,0	86	13	1
4,0	31	16	53
5,5	41	3	56
7,5	16	8	76
9,5	17	6	77
10,5	13	13	74
12,5	15	11	74

Tabela 21: Composição relativa da massa reacional ao longo do tempo para $[S_0] = 500$ g/l

Tempo (h)	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)
2,0	73	15	15
4,0	48	4	48
6,0	31	5	64
8,0	24	4	72
10,0	17	5	78
22,5	10	9	81
24,5	12	6	82

As figuras 32 e 33, ilustram o andamento da reação, com praticamente apenas o pico correspondente à dextrana nativa no início (2 horas) e apenas o das dextranas menores no final (24 horas).

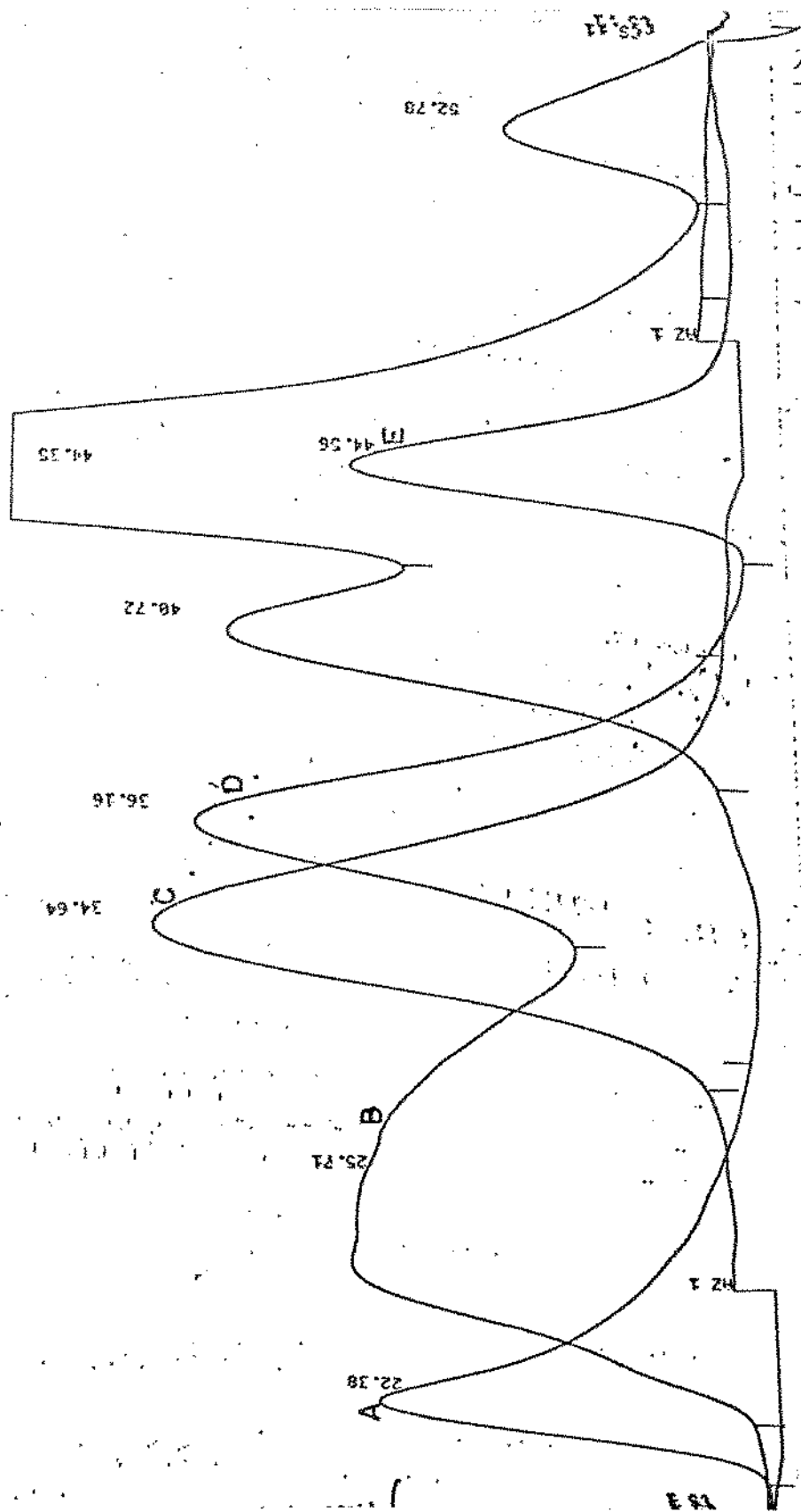


Figura 32: Cromatograma obtido da injeção de amostra com 2 horas de síntese a 25°C, 30 UDS/ml e concentração inicial de sacarose de 500 g/l. A é o cromatograma da amostra; B do padrão de $\overline{PM} = 2 \times 10^6$; C de $\overline{PM} = 4 \times 10^4$; D de $\overline{PM} = 11 \times 10^3$ e E do padrão de glicose

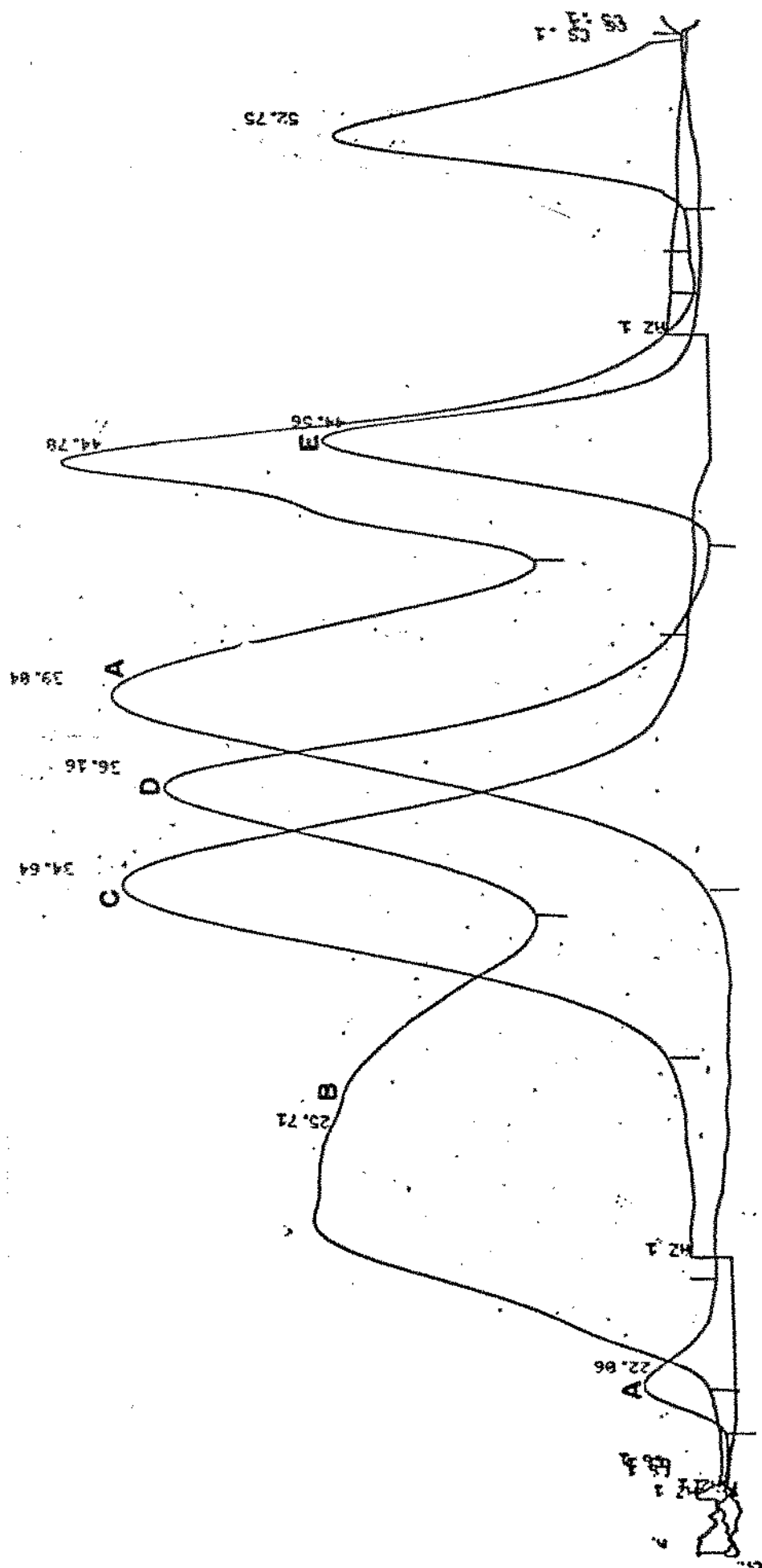


Figura 33: Cromatograma obtido da injeção de amostra com 24 horas de síntese a 25°C , 30 UDS/ml e concentração inicial de sacarose de 500 g/l. A é o cromatograma da amostra; B do padrão de $\overline{\text{PM}} = 2 \times 10^6$; C de $\overline{\text{PM}} = 4 \times 10^4$; D de $\overline{\text{PM}} = 11 \times 10^3$ e E do padrão de glicose

Pelo que foi descrito anteriormente fica evidenciado que em baixas concentrações de sacarose (50 e 100 g/l), quando a frutose liberada não atinge concentração suficiente para sua atuação como aceptor, não há alteração na distribuição de peso molecular ao longo da síntese. O mesmo não ocorre quando a sacarose inicial é aumentada. Para as concentrações mais altas ocorre a formação da dextrana de baixo peso molecular (em torno de 4.000 daltons em todos os casos), com um aumento mais acentuado desse $\overline{PM}$ para as concentrações mais altas de sacarose. Obteve-se, desta forma, na concentração de sacarose de 500 g/l, 80% das dextranas na faixa de peso molecular próximo a 4.000 daltons.

b. Rendimentos obtidos

Assim como há um decréscimo acentuado na velocidade de reação com o aumento na concentração inicial de sacarose, uma diminuição de rendimento em relação às dextranas totais também foi constatada.

Na tabela 22 são apresentados os rendimentos obtidos, calculados em relação à concentração teórica máxima de dextrana, dada pela expressão (PAUL et al. (1986)):

$$[\text{dextrana}]_{\text{teórica}} = [\text{sacarose}]_{\text{inicial}} \times 0,474$$

Tabela 22: Concentrações de dextrana e rendimentos obtidos

[Sacarose] _{inicial} (g/l)	Tempo de reação (h)	[Dextrana] _{obtido} (g/l)	[Dextrana] _{leor.} (g/l)	Rend. (%)
50	3,0	20,3	33,7	85
100	4,0	41,0	47,4	86
200	8,0	66,7	94,8	70
300	10,0	98,9	142,2	69
400	13,5	118,0	189,6	62
500	26,5	130,0	237,0	55

Essa queda no rendimento, em termos de dextrana total, foi anteriormente verificada por TSUCHIYA et al. (1953) e por ALSOP (1983), sendo justificada pelo aumento na concentração de frutose no meio devido às altas concentrações de sacarose. Os resíduos de frutose atuam como acceptor deslocando resíduos glicosídicos ligados à enzima formando leucrose (KOEPEL et al. (1952) e ROBYT & WALSETH (1978)), que por sua vez não atua como acceptor. Desta forma, ocorre um desvio dos resíduos glicosídicos para a síntese de leucrose, em detrimento da formação de dextrana.

Além da diminuição do rendimento em dextranas totais, uma diminuição ainda mais drástica ocorre na formação das dextranas de alto peso molecular, como pode ser constatado na tabela 23. Nesta tabela os resultados para dextrana de peso molecular intermediário são omitidos, já que sua proporção permanece aproximadamente constante em todas as concentrações de sacarose testadas, girando em torno de 15-20% das dextranas totais obtidas.

Tabela 23: Quantidades relativas de dextranas de alto peso molecular (APM) e baixo peso molecular (BPM) no produto final (por 100 g de substrato)

[Sacarose] _{inicial} g/l	50	100	200	300	400	500
[dextrana] _{APM}	28,4	28,7	13,3	9,9	4,4	2,6
[dextrana] _{BPM}	4,4	6,1	15,0	16,5	22,1	20,8

Embora em termos absolutos haja uma queda no rendimento das dextranas totais, há um aumento bastante significativo na proporção das dextranas de baixo peso, como descrito no item anterior.

Apesar da alta porcentagem (80%) de dextranas de baixo peso molecular com peso molecular médio de 4.000 daltons, para uma concentração de sacarose de 500 g/l, o uso destas condições para produção do polissacarídeo, visando a produção de Fe-Dextrana fica inviabilizado pelo baixo rendimento global e pelo tempo de reação que atinge mais de 24 horas.

2.2.2. Reações com acceptor

Como já citado anteriormente, o estudo da influência da maltose como acceptor glicosídico na reação de dextrana foi feito variando-se a concentração desta para três diferentes concentrações de sacarose, de modo a se obter três valores de R para cada concentração de sacarose. Esta variação foi feita para verificação da influência da concentração de maltose na distribuição de peso molecular e nos rendimentos das reações, onde ela é o único accep-

tor atuante (para baixa concentração de sacarose - 100 g/l) ou naquelas em que a frutose atinge concentrações suficientemente elevadas para também atuar como um acceptor glicosídico na formação de dextrana.

a. Variação do peso molecular ao longo da reação

• Concentração de sacarose 100 g/l e R = 0,02

Para uma concentração inicial de sacarose de 100 g/l e R = 0,02 ou seja, concentração de maltose igual a 2 g/l, inicialmente existem apenas dextranas de alto peso molecular, surgindo a seguir um pico bem definido, correspondente à dextranas de peso molecular médio em torno de 3.500 daltons. Com a evolução da reação, essa dextrana sofre um ligeiro aumento de peso molecular que atinge algo em torno de 5.000 daltons no final da reação.

Esse aumento de peso molecular que pode ser observado na figura 34, foi anteriormente constatado por KOEPSSELL et al. (1952) e TSUCHIYA et al. (1955) e tem sua explicação no mecanismo proposto por ROBYT & WALSETH (1978) para as reações na presença de aceptores. A maltose presente no meio faz um ataque nucleofílico ao resíduo glicosídico ligado à enzima, formando um trissacarídeo identificado como panose, que quando atinge determinadas concentrações passa também a atuar como acceptor, formando assim um tetrassacarídeo e assim por diante, dando origem a uma série de oligossacarídeos homólogos com grau de polimerização crescente.

A atuação da maltose na redução do peso molecular da dextrana formada na concentração de sacarose de 100 g/l, é verificada (Tabela 24) quando os resultados obtidos são comparados àqueles onde apenas sacarose estava inicialmente presente, havendo formação quase que exclusiva de dextranas de alto peso molecular. Entretanto, a quantidade de maltose não foi suficiente para obtenção de um produto homogêneo de baixo peso molecular.

Tabela 24: Composição da massa reacional ao longo do tempo para $[S_0] = 100 \text{ g/l}$ e $R = 0,02$

Tempo (h)	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)
0,5	98	—	2,0
1,0	83	11	6,0
1,5	55	9	36
2,0	58	8	34
4,0	56	4	40

• Concentração de sacarose 100 g/l e $R = 0,01$

Neste caso foi observado um comportamento bastante semelhante ao caso anterior, com formação de dextranas de baixo peso molecular em torno de 3.500 e aumento para 5.000 daltons, embora em menores proporções. Uma alteração significativa foi constatada nas faixas de peso molecular alto e intermediário onde uma grande dispersão foi verificada, surgindo uma pequena concentração na faixa de peso molecular em torno de 30.000 daltons. O produto final obtido embora bastante heterogêneo, como no caso anterior, tem

predomínio de dextranas de peso molecular alto e intermediário. Este fato é justificado pela concentração de maltose mais baixa, o que propicia a formação de espécies com peso molecular mais elevado que no caso anterior. A tabela 25 apresenta a composição da massa reacional ao longo do tempo.

Tabela 25: Composição da massa reacional ao longo do tempo para $[S_0] = 100 \text{ g/l}$ e $R = 0,01$

Tempo (h)	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)
0,3	48	44	8,0
0,7	49	46	5,0
1,0	51	37	12,0
2,0	45	28	27,0
3,0	40	29	31

• Concentração de sacarose 100 g/l e $R = 0,005$

Com a diminuição na concentração de maltose, a formação de dextranas de baixo peso não fica evidenciada pelo surgimento de um pico bem definido, embora elas estejam presentes em pequena quantidade. Surge neste caso, um pico bastante disperso na faixa intermediária, com peso molecular médio em torno de 30.000 daltons como ilustrado na Figura 35. No final da reação foi obtido um produto com distribuição de peso molecular bastante diversificado, com predominância de dextranas de peso molecular alto e intermediário, mais acentuadamente nesta última faixa.

A tabela 26 mostra a evolução de peso molecular ao longo do tempo.

Tabela 26: Composição da massa reacional ao longo do tempo para $[S_0] = 100 \text{ g/l}$ e $R = 0,005$

Tempo (h)	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)
0,5	38	55	7,0
1,0	30	65	7,0
1,5	37	55	8,0
2,0	46	19	5,0
3,0	25	60	15,0

As características principais das dextranas produzidas nas concentrações acima descritas são a grande heterogeneidade quanto à distribuição de peso molecular, aumento do peso molecular médio das espécies formadas com a diminuição da concentração de maltose utilizada.

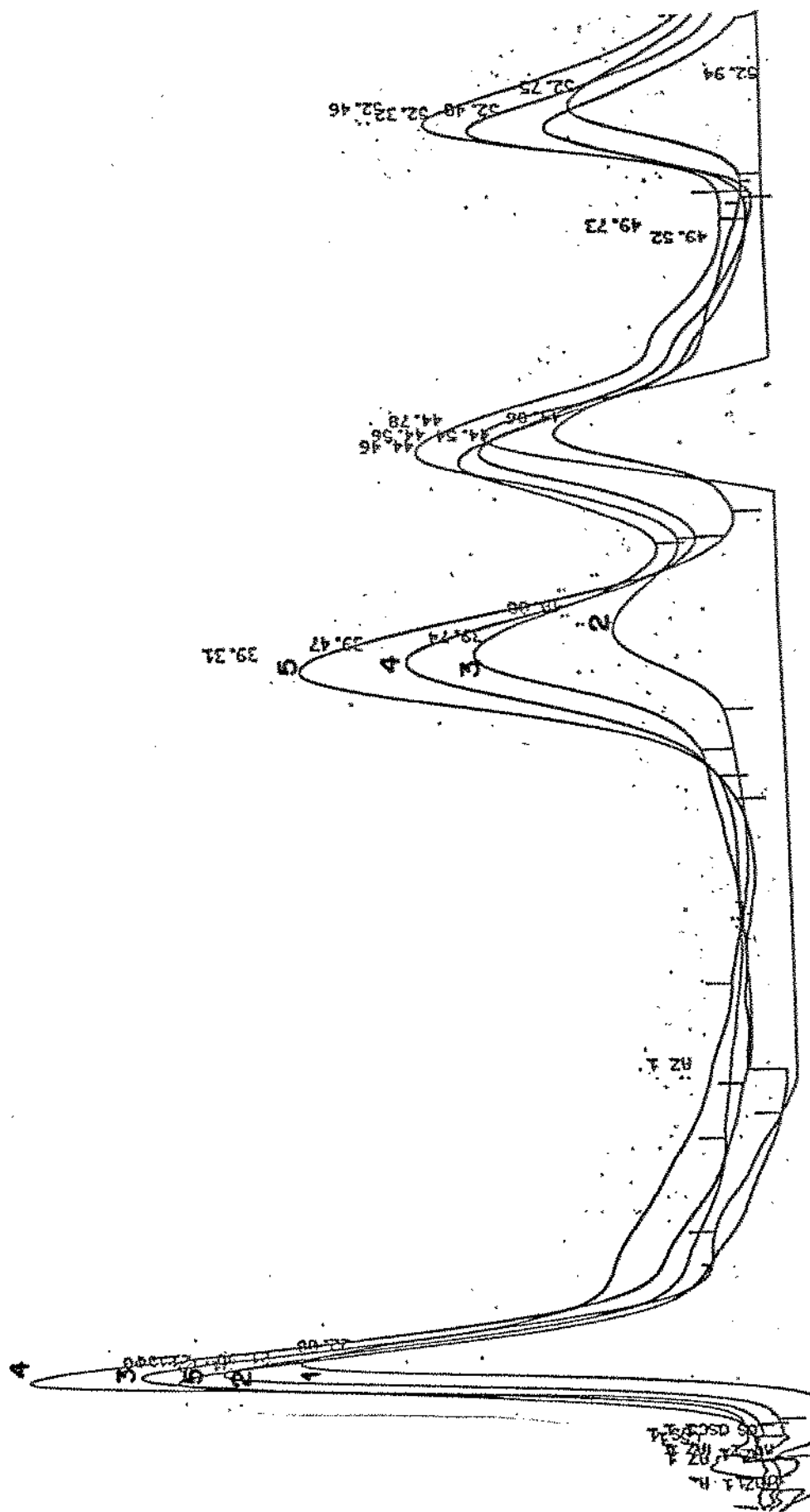


Figura 34: Cromatogramas sobrepostos das amostras retiradas ao longo da

síntese enzimática a 25°C, 30 UDS/ml, $S_0 = 100$ g/l e $R = 0,02$,

onde 1 representa o cromatograma da amostra correspondente a

a 30 min de reação, 2 a 1 hora, 3 a 1 hora e 30 min, 4 a 2 ho-

ras

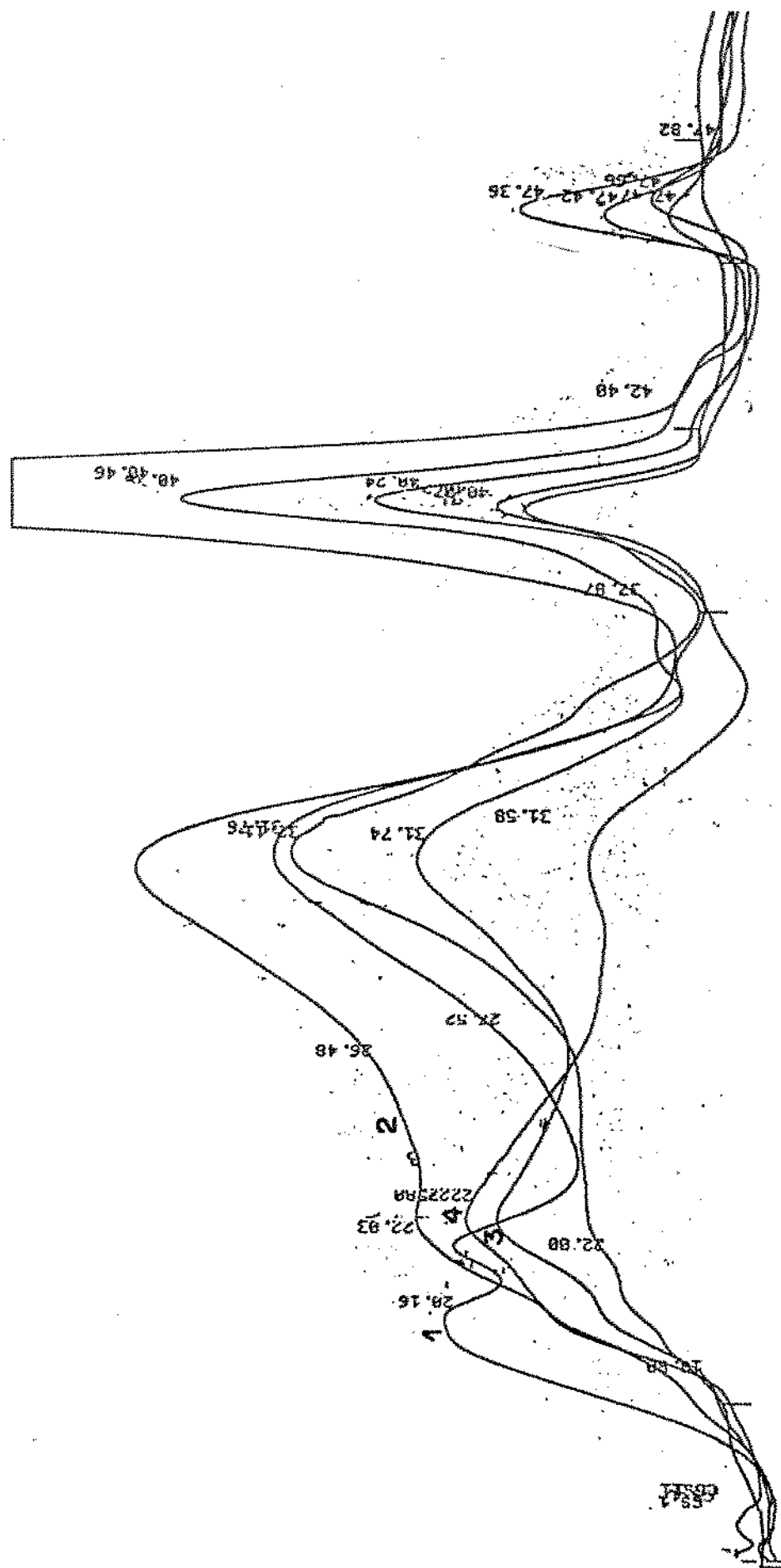


Figura 35: Cromatogramas sobrepostos das amostras retiradas ao longo da

síntese enzimática a 25°C, 30 UDS/ml, 80 = 100 g/l e R = 0.005,

onde 1 representa o cromatograma da amostra correspondente a

20 min de reação, 2 a 1 hora, 3 a 1 hora e 40 min e 4 a 2 ho-

ras

- Concentração de sacarose 200 g/l e R = 0,02

Nestas condições de ensaio, logo no início da síntese (30 minutos) estão presentes no meio reacional dextranas de peso molecular alto e baixo ($\overline{PM} = 2500$) praticamente nas mesmas proporções. No decorrer do processo, há uma diminuição na porcentagem das espécies na faixa de peso molecular alto, com aumento na de baixo peso molecular. Acompanhando o aumento na produção destas dextranas, seu peso molecular também aumenta atingindo valores em torno de 9.000 daltons no final da reação, com picos que vão se alargando demonstrando um aumento na dispersão.

Na faixa intermediária, embora constatado um crescimento significativo na produção, não se forma nenhum pico definido, havendo aí uma grande dispersão de peso molecular.

Embora haja neste caso maior produção de dextranas de baixo peso molecular, quando comparado com o ensaio de mesma concentração de sacarose sem maltose, o produto final obtido é ainda bastante heterogêneo quanto à distribuição de peso molecular, como pode ser visto na Tabela 27. Aparentemente, para que possa haver uma maior produção das espécies moleculares menores, há necessidade de maiores concentrações de maltose (valor mais alto de R).

Tabela 27: Composição da massa reacional ao longo do tempo para
 $S_0 = 200 \text{ g/l}$ e $R = 0,02$

Tempo (h)	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)
0,5	44	10	46
1,5	17	13	70
2,0	12	8	80
2,5	21	17	60
3,0	18	25	57
4,0	13	24	63

• Concentração de sacarose 200 g/l e $R = 0,01$

Obteve-se neste caso um comportamento bastante semelhante ao observado para 100 g/l e mesmo R , havendo no início grande quantidade de dextranas de peso molecular intermediário e alto. Com o correr do tempo um pico na faixa de peso molecular baixo se define, e sua concentração aumenta, bem como seu peso molecular que varia de 3000 até aproximadamente 10.000 daltons no final do processo. Há uma diminuição na quantidade das dextranas de alto peso molecular. A quantidade das dextranas intermediárias em relação às outras se mantem num valor praticamente constante, superior àquele obtido anteriormente (em torno de 45-50% das dextranas totais). Assim, no produto final há predominância de dextranas de médio e alto PM, principalmente de peso molecular intermediário, com grande dispersão. A tabela 28, traz os dados do acompanhamento da composição do meio durante a reação.

A Figura 36 traz o cromatograma obtido para a amostra final, onde a grande dispersão pode ser observada.

Tabela 28: Quantidades das dextranas nas três faixas de peso molecular em relação às dextranas totais para $[S_0] = 200$ g/l e $R = 0,01$

Tempo (h)	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)
0,5	42	51	7
1,5	32	41	27
5,0	9	47	44
6,0	5	45	50
7,0	10	42	48

• Concentração de sacarose 200 g/l e $R = 0,005$

Para estas concentrações de açúcares o perfil das distribuições de peso molecular praticamente não se altera ao longo da reação, coexistindo sempre dextranas de peso molecular alto, intermediário e baixo praticamente nas mesmas proporções, como pode ser observado na Tabela 29.

Na faixa de peso molecular menor que 4×10^4 , percebe-se que há uma grande dispersão que aumenta com a conversão.

Tabela 29: Composição da massa reacional ao longo do tempo para

[Sol] = 200g/l e R = 0,005

Tempo (h)	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)
1	36	34	30
2	30	25	45
3	23	40	37
4	25	31	44
5	27	46	47
6	32	28	40

Em comparação com os resultados obtidos para a concentração de 100g/l, obteve-se neste caso uma produção mais direcionada para as espécies menores principalmente para os valores mais elevados de R. Entretanto, os produtos ainda são bastante heterôgeneos, exigindo para sua utilização como matéria-prima para obtenção de Fe- dextrana alguma espécie de fracionamento, o que tende a tornar o rendimento em termos das espécies de interesse ainda menor.

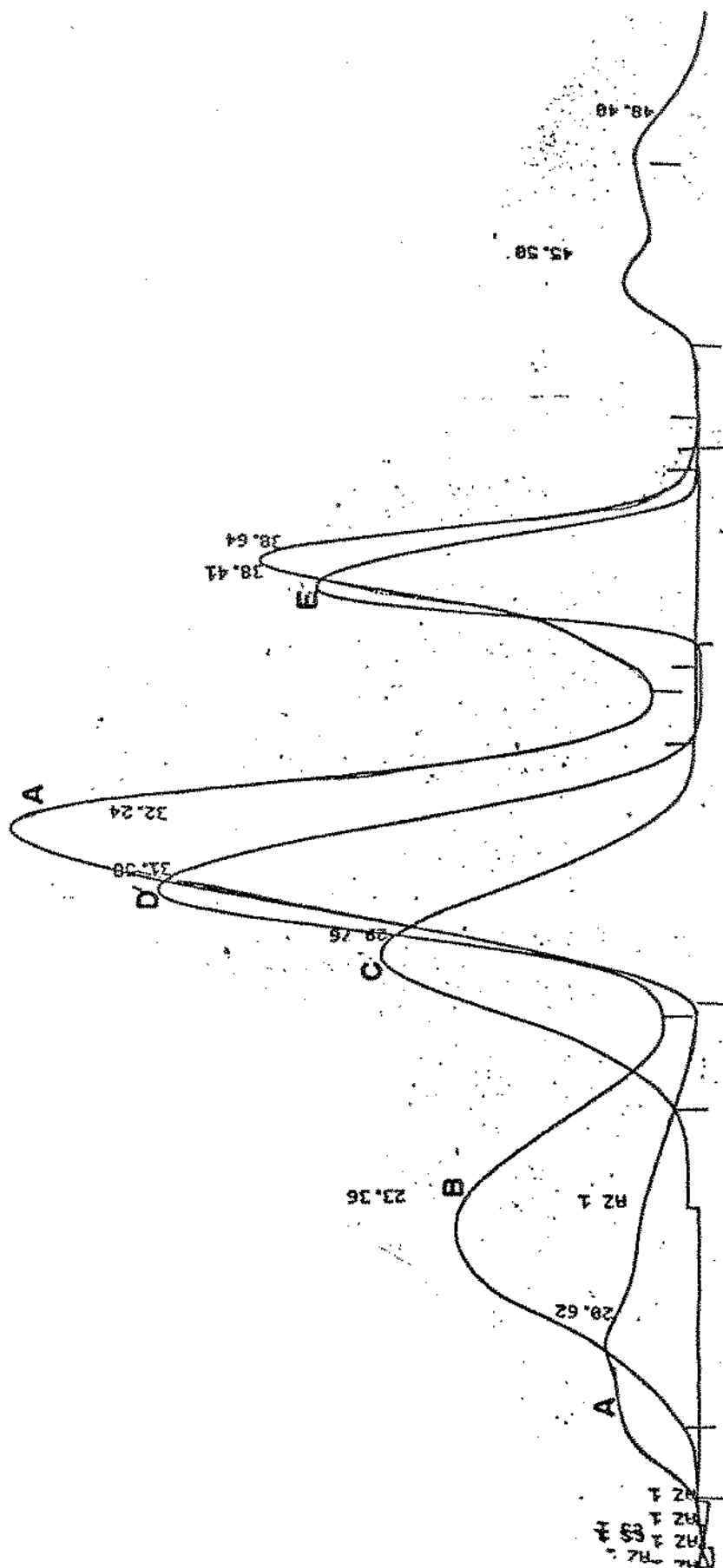


Figura 36: Cromatograma obtido da injeção da amostra final de síntese a

25°C, 30 UDS/ml, $S_0 = 200$ g/l e $R = 0,01$. A é o cromatograma

da amostra; B do padrão de $\overline{PM} = 2 \times 10^6$; C de $\overline{PM} = 4 \times 10^4$; D de

$\overline{PM} = 11 \times 10^3$ e E do padrão de glicose

• Concentração de sacarose 300 g/l e R = 0,02

Com o aumento na concentração de sacarose, apesar de estarem presentes dextranas nas três faixas de peso molecular nas mesmas proporções no início da síntese, a relação entre as de baixo peso e as demais aumenta grandemente ao longo do processo, como pode ser observado na Tabela 30.

Tabela 30: Composição da massa reacional ao longo do tempo para [So] = 300 g/l e R = 0,02

Tempo (h)	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)
1,0	38	23	39
2,0	25	11	64
4,0	12	16	72
6,0	5	22	73
8,0	6	10	84
9,0	5	9	86

Como anteriormente observado neste valor de R a dextrana de baixo peso, sofre um ligeiro aumento de peso molecular durante o processo, passando de 2000 para 3500.

• Concentração de sacarose 300 g/l e R = 0,01

O mesmo comportamento do caso anterior foi observado, no entanto não há predominância tão acentuada de dextranas na faixa de interesse, sendo seu peso molecular final um pouco maior, em torno de 9000.

- Concentração de sacarose 300 g/l e R = 0,005

Neste caso, o produto final é ainda mais heterogêneo, sendo que as espécies de baixo peso molecular, têm uma concentração ligeiramente superior às demais, e seu peso molecular atinge valores da ordem de 12000.

A Tabela 31, ilustra o andamento das reações com 300 g/l de sacarose e os valores de R de 0,01 e 0,005.

Tabela 31: Composição da massa reacional ao longo do tempo para [So] = 300 g/l e R= 0,01 e 0,005

Tempo(h)	R = 0,01			R = 0.005		
	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)	PM Alto (%)	PM Intermediário (%)	PM Baixo (%)
1	32	31	37	42	48	10
2	35	5	60	55	20	30
3	26	14	60	35	10	55
5	19	15	66	21	19	60
6	10	15	75	20	21	58
8	11	22	67	21	22	57

A Figura 37 apresenta os cromatogramas sobrepostos de todas as amostras analisadas para R = 0,02.

Do exposto até aqui pode-se notar que a obtenção da dextrana de baixo peso molecular não é função apenas do valor de R utilizado, mas também da concentração de sacarose a ele associado. Para um mesmo valor de R, por exemplo 0,02, no qual os melhores resultados foram obtidos, produtos com diferentes composições foram

formados nas diferentes concentrações de substrato. Quanto maior a concentração de sacarose utilizada, maior a produção das dextranas na faixa de interesse.

A Tabela 32 apresenta um resumo dos resultados obtidos no que diz respeito ao peso molecular final nas diversas concentrações de sacarose e maltose. Pode-se perceber que para um mesmo valor de sacarose, a medida que R diminua, o peso molecular dos pequenos polissacarídeos aumenta com exceção de $R = 0$, onde o surgimento das dextranas de baixo peso molecular, se deve exclusivamente ao aumento na concentração de frutose.

Embora com o pequeno número de pontos não se possa confirmar o comportamento linear do peso molecular com o valor de R, citado por PAUL et al. (1986) pode-se dizer que a variação do peso molecular não é função apenas do valor de R, mas também da concentração de sacarose inicial, principalmente para valores superiores a 200 g/l.

Tabela 32: Peso molecular médio da menor espécie presente no final da síntese, nas várias concentrações de açúcares

[Sacarose] (g/l)	Peso Molecular			
	$R = 0,02$	$R = 0,01$	$R = 0,005$	$R = 0$
100	5.000	5.000	30.000	grande dispersão
200	9.000	10.000		4.000
300	3.500	9.000	12.000	4.000

O produto obtido com concentração de sacarose de 300 g/l e $R = 0,02$ corresponde ao desejado, havendo formação de dextranas de peso molecular mais alto em pequenas proporções, estando o peso molecular da maioria na faixa adequada, ou seja em torno de 3000.

A massa reacional obtida pode ser utilizada diretamente na etapa de complexação com Fe, mas caso isso não seja possível, uma precipitação com etanol ou acetona em concentrações em torno de 50%, deve eliminar as dextranas de alto peso molecular, deixando em solução apenas aquelas na faixa mais adequada.

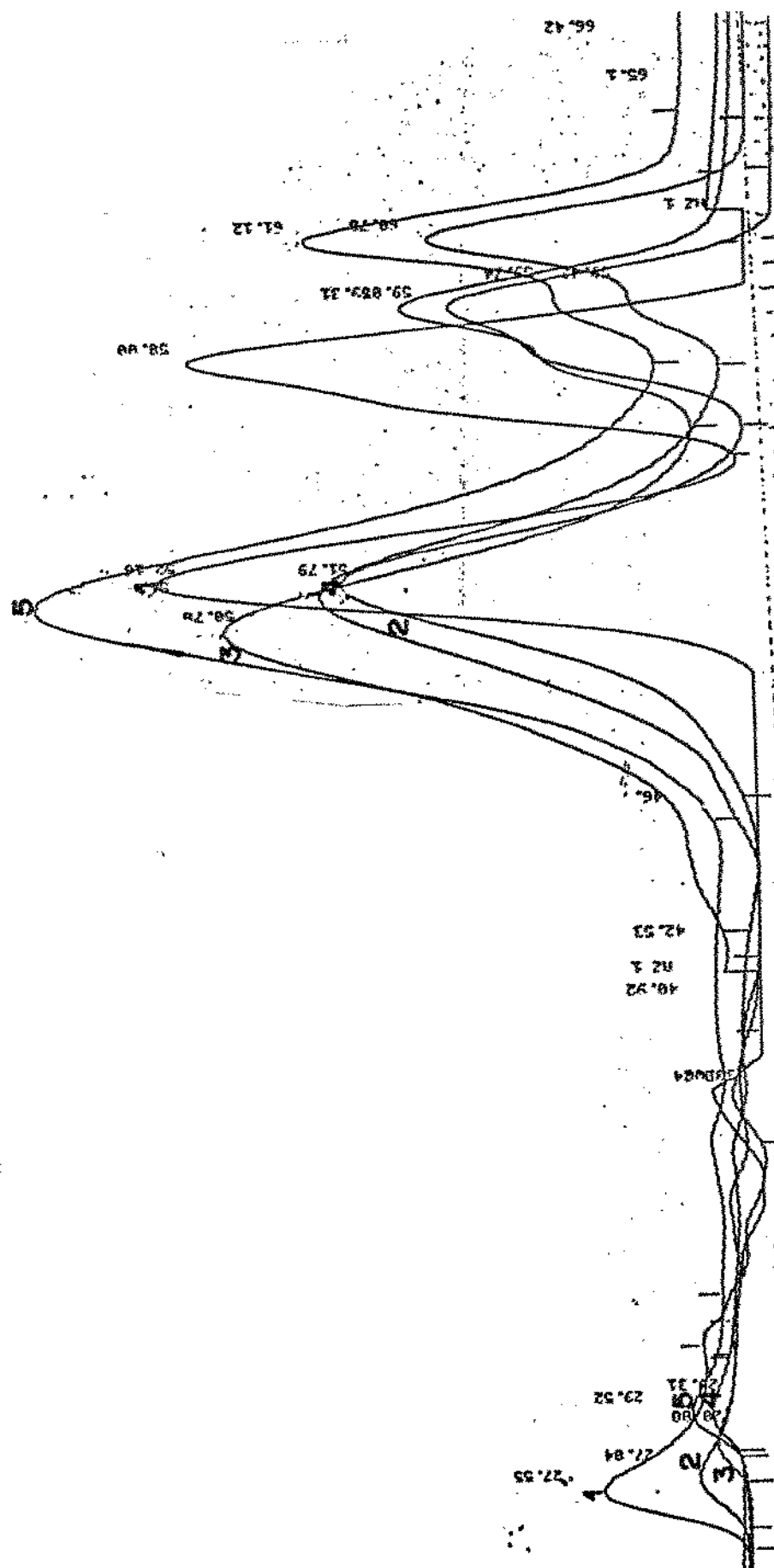


Figura 37: Cromatogramas sobrepostos para a reação a 25°C, 30 UDS/ml, 50=300 g/l e $R = 0,02$, onde 1 representa o cromatograma da amostra

correspondente a 2 horas de reação, 2 a 4 horas, 3 a 6 horas, 4 a 8 horas e 5 a 9 horas

2.2.2. Rendimentos obtidos

De maneira geral houve um aumento no rendimento de dextranas totais com o uso de maltose, em comparação às reações em que esta não foi utilizada. Apenas para o valor de $R = 0,005$ nas concentrações de sacarose de 200 e 300 g/l, houve um decréscimo bastante acentuado.

A Tabela 33, traz os dados das concentrações finais de dextranas totais obtidas e o rendimento a elas correspondentes, para as concentrações de sacarose e maltose utilizadas. Na presença de maltose, esta é consumida e incorporada nas cadeias de dextrana, portanto o cálculo do rendimento deve levar em conta sua concentração inicial. Os valores para $R = 0$ foram incluídos para efeito comparativo.

Tabela 33: Concentrações e rendimentos obtidos

[Sacarose] (g/l)	R	[Dextrana] (g/l)	Rendimento ^(a) (%)
100	0	41	87
	0,005	42	87
	0,01	44	91
	0,02	43	87
200	0	67	71
	0,005	57	59
	0,01	71	73
	0,02	88	89
300	0	99	70
	0,005	82	57
	0,01	99	68
	0,02	114	77

(a) Para $R = 0$; rendimento = $[\text{dextrana}]/[\text{sacarose}] \times 0,474$,
e $R > 0$; rendimento = $[\text{dextrana}]/([\text{sacarose}] \times 0,474 + [\text{maltose}])$

A Figura 38, ilustra os dados da tabela, onde o comportamento do rendimento com o aumento de R pode ser observado.

Para uma visualização do efeito do aumento das concentrações de sacarose e maltose sobre o rendimento das espécies moleculares de interesse, foram contruídas as Figuras 39, 40 e 41 que representam o rendimento das dextranas nas três faixas de peso molecular em função da sacarose inicial utilizada. As Figuras 39 e 40 mostram a tendência de variação de rendimento para as espécies de peso molecular alto e intermediário respectivamente, não sendo

possível determinar um padrão de comportamento, principalmente neste último caso. No caso das dextranas de alto peso molecular, percebe-se que as maiores concentrações aparecem nos valores mais baixos de S_0 , e menores de R , principalmente para $R = 0$, ou seja na ausência de maltose.

Pela figura 41, para as dextranas de baixo peso molecular, cuja obtenção é o principal objetivo deste trabalho, perceber-se um comportamento contrário ao da figura 39, ou seja as maiores concentrações são obtidas para valores mais altos de R e S_0 .

Os melhores valores obtidos são para $S_0 = 300$ g/l e $R = 0,02$, condições nas quais o peso molecular dessas espécies está dentro da faixa de interesse, com uma concentração final da ordem de 95 g/l. Este valor é bastante interessante, sendo quase três vezes superior à concentração obtida com a reação enzimática com 100 g/l de sacarose na ausência de maltose seguida de hidrólise ácida, realizada nos laboratórios da CODETEC (CURRALERO et al. (1991)).

Outras condições em que o peso molecular obtido enquadra-se na faixa pretendida apresentam alguns inconvenientes como, rendimento baixo, grande dispersão e heterogeneidade.

Na ausência de maltose embora se formem as dextranas pretendidas, para valores de S_0 mais baixos, onde o rendimento em dextranas totais situa-se na faixa de 70% (pouco inferior aos 77% para $S_0 = 300$ g/l e $R = 0,02$) o produto é muito heterogêneo, havendo necessidade de etapas de fracionamento, para obtenção de no máximo 30 g/l das espécies de interesse. Com o aumento da concentração de sacarose, embora haja um aumento na concentração das

dextranas pequenas, o rendimento global é muito baixo, além das reações serem muito lentas.

Em outras condições embora o rendimento global possa ser um pouco mais alto, o produto é bastante heterogêneo, fazendo com que os rendimentos das espécies de interesse sejam bastante baixos, havendo ainda necessidade de fracionamentos, que além de abaixarem ainda mais esses valores, trazem aumento no custo do processo.

Poderiam ser testados valores mais altos de sacarose e maltose, no entanto pela tendência observada nos estudos realizados, embora deva haver maior formação de dextranas de baixo peso, o rendimento global obtido talvez não justifique um gasto maior com matérias-primas, além da grande possibilidade de uma diminuição no peso molecular, abaixo de 2000, o que inviabilizaria o processo.

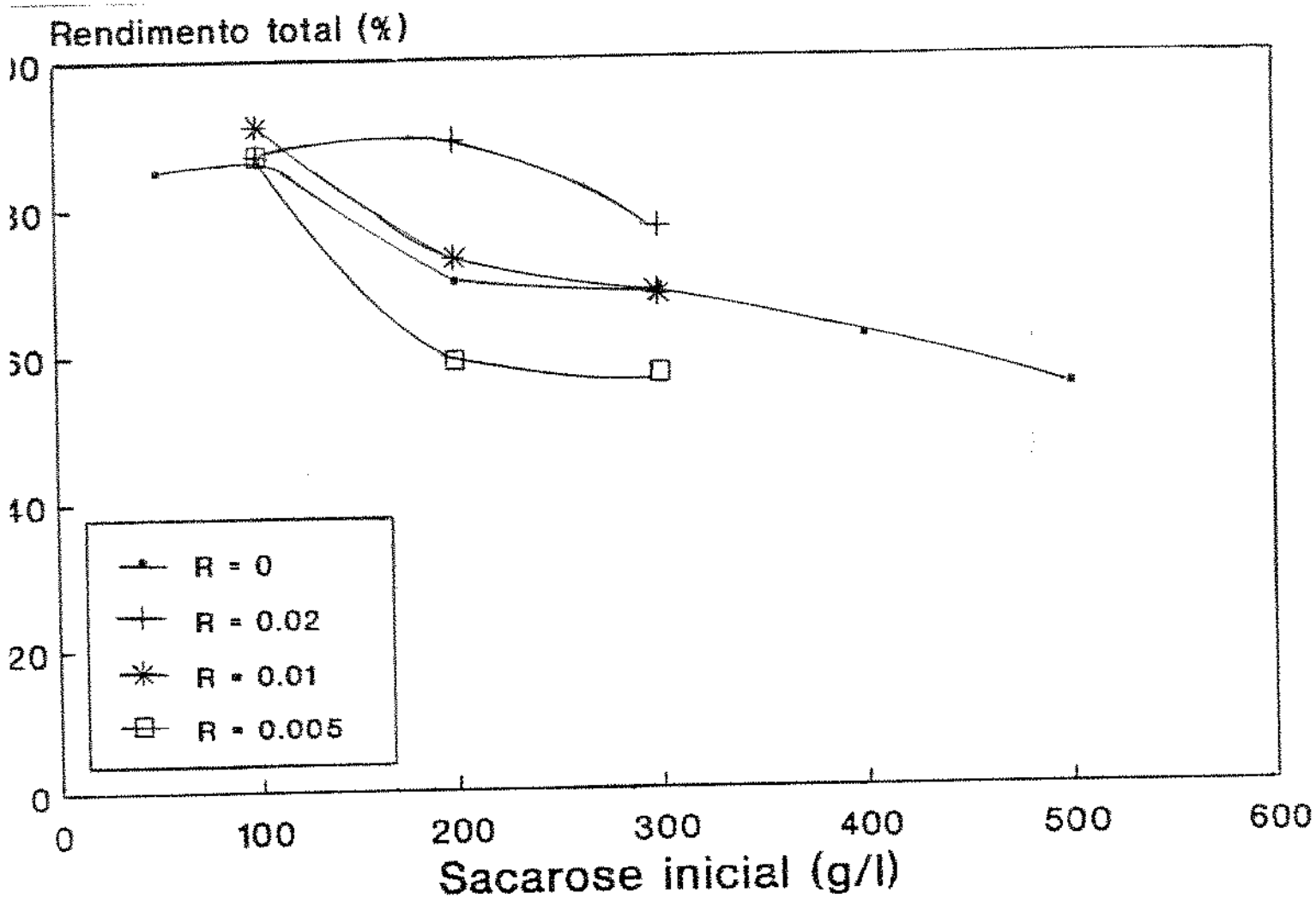


Figura 38: Rendimento global (dextranas totais) em função da concentração inicial de sacarose para vários valores de R

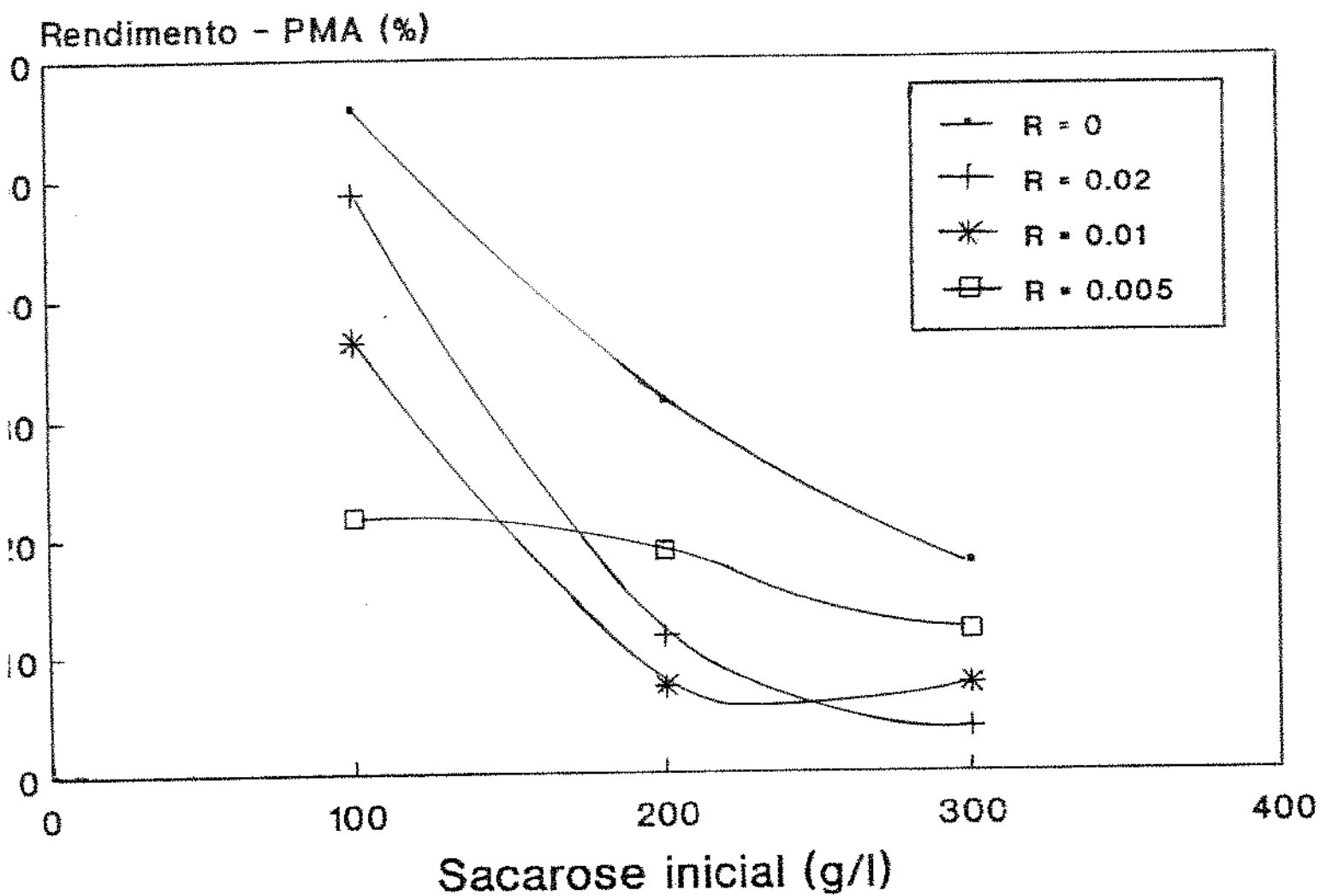


Figura 39: Rendimento das dextranas de peso molecular alto (PMA) em função da concentração inicial de sacarose para vários valores de R

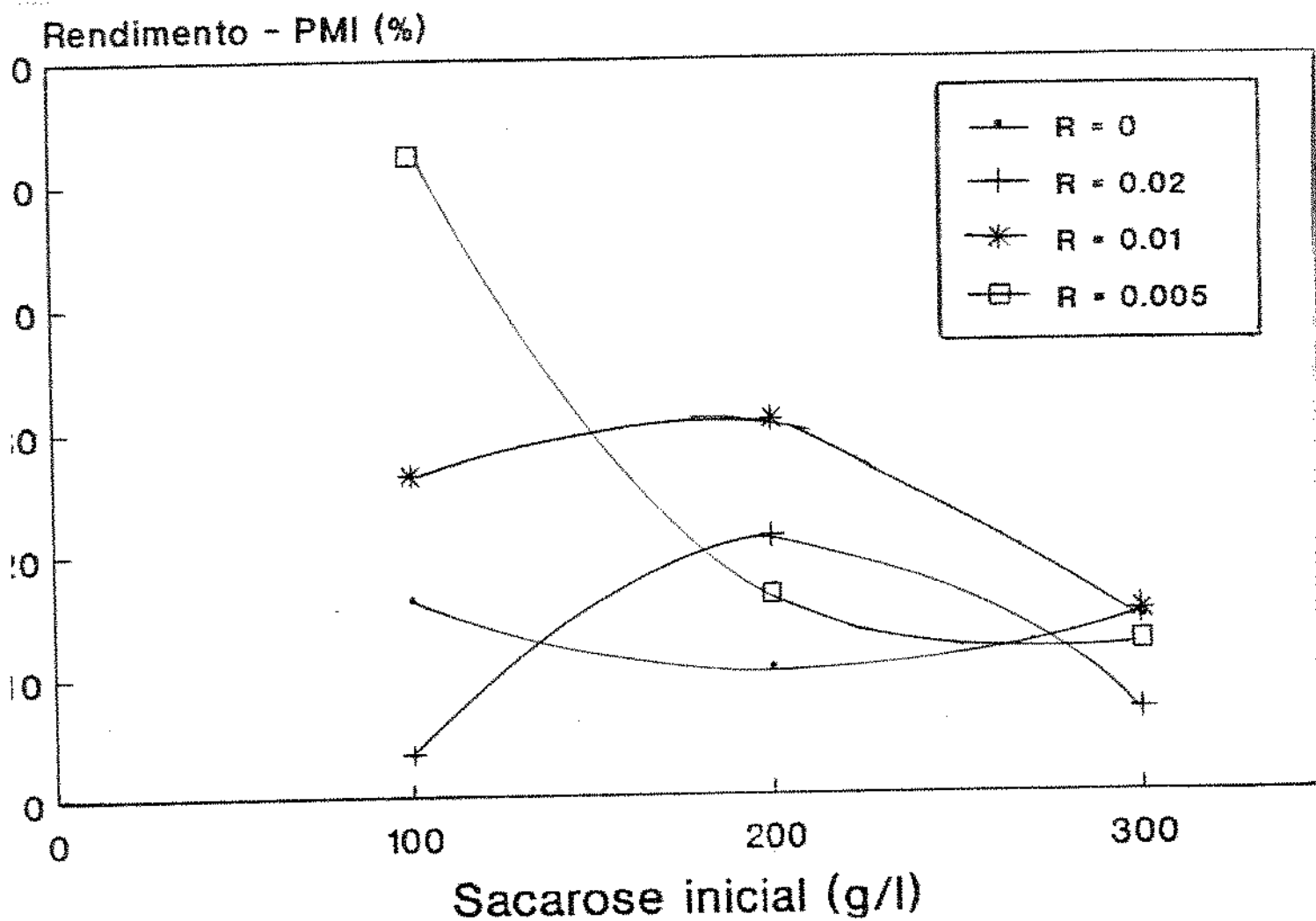


Figura 40: Rendimento das dextranas de peso molecular intermediário (PMI) em função da concentração inicial de sacarose para vários valores de R

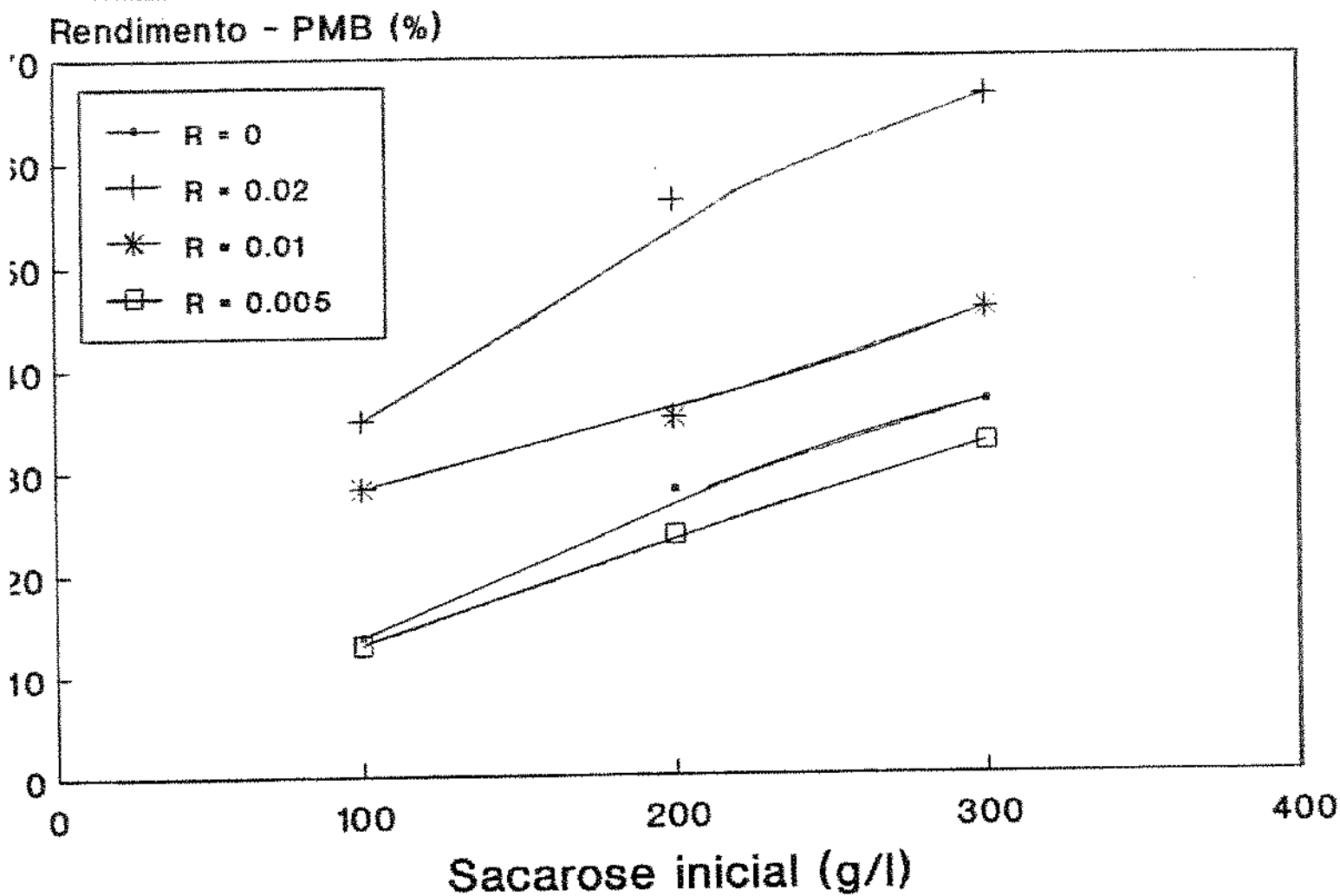


Figura 41: Rendimento das dextranas de peso molecular baixo (PMB) em função da concentração inicial de sacarose para vários valores de R

3. ASPECTOS ECONOMICOS E DE PROCESSO

Tendo em vista os resultados apresentados anteriormente e utilizando alguns dados obtidos durante o desenvolvimento de um processo tradicional de obtenção de ferro dextrana, realizado nos laboratórios da CODETEC, foi feita uma análise a nível de custo de matérias-primas utilizadas. Além dos custos, são apresentadas e comentadas algumas particularidades dos processos com reação enzimática usando maltose ou com reação enzimática seguida de hidrólise. Os cálculos foram feitos visando a produção de 1 kg de dextrana de baixo peso molecular.

3.1. REAÇÃO ENZIMÁTICA COM MALTOSE

A Tabela 34 apresenta as massas das matérias-primas utilizadas para produção de 1 kg de produto e o preço em dolar americano a elas associado. Foi considerado o processo com 300 g/l de sacarose e 6 g/l de maltose ($R = 0,02$) com uma conversão de 32% de dextrana de peso molecular adequado.

Tabela 34: Coeficientes de consumo e custo para a produção de 1 kg de dextrana de baixo peso molecular

Matéria-prima	Coeficiente de consumo (kg/kg)	Preço Unitário (US\$/kg)	Preço US\$ Total
Dextrana-sacarase ^(a)	$3,2 \times 10^5$ ^(b)	-	0,34 ^(a)
Sacarose	3,15	0,20	0,63
Maltose	0,063	190,00 ^(c)	11,97

(a) Esta dextrana-sacarase significa o concentrado enzimático bruto e seu custo foi estimado a partir de um processo em batelada alimentada numa fermentação de 10 l

(b) Este valor refere-se às unidades de dextrana-sacarase necessárias para o processo enzimático com 30 UDS/ml

(c) Este preço corresponde aquele para aquisição de 250g de maltose P.A., devendo sofrer diminuição para quantidades maiores em grau farmacêutico.

Da Tabela 34 podemos calcular um custo de US\$ 12,94/kg de dextrana de baixo peso, o que é alto quando comparado ao processo tradicional. A viabilidade deste processo, portanto, não depende apenas da qualidade e quantidade do produto formado, mas de outras inovações tecnológicas como uso de enzima imobilizada, possível utilização do xarope de maltose em estudo na Refinações de Milho Brasil, de custo mais acessível. Existem algumas vantagens a nível de processo e instalações que podem tornar este processo interessante a nível industrial, que são as seguintes:

- o volume de reação envolvido é da ordem de 10l, inferior aquele empregado na reação enzimática seguida de hidrólise,
- existe ainda a possibilidade de o isolamento e purifi-

cação da frutose produzida durante o processo, que tem um preço aproximado de US\$ 20,00/kg.

- a massa de dextrana de baixo peso molecular obtida por batelada é superior, já que a concentração de sacarose inicial é maior.

- não há neste caso necessidade de reatores com revestimento interno (tipo Pfaudler), já que os valores de ph não são inferiores a 5,0.

- existe maior viabilidade na utilização de enzima imobilizada já que a massa reacional não apresenta altas viscosidades, o que facilita sua recuperação, havendo diminuição nos custos.

V. CONCLUSOES

Dos resultados obtidos pode-se concluir, que dentre os processos fermentativos testados, aquele que mais se adequou aos estudos pretendidos foi o da batelada com controle de pH, pelas baixas concentrações de açúcares redutores e dextrana no final do processo. Isto não descarta no entanto a utilização da batelada com alimentação de sacarose, onde atividades bem mais altas são alcançadas. Neste caso, alguns testes nas condições de síntese enzimática mais propícias, poderiam elucidar se o efeito dos açúcares redutores residuais e da dextrana interfeririam de forma importante na qualidade do produto formado.

Quanto às condições da síntese enzimática, percebeu-se que o aumento na concentração inicial de sacarose traz uma diminuição nas velocidades iniciais de reação, acarretando tempos de reação crescentes. A quantidade de dextranas de peso molecular médio na faixa de 4000 daltons aumenta significativamente para concentrações de sacarose superiores a 200 g/l.

Com a utilização de maltose como aceptor, obtém-se para uma mesma concentração de sacarose, rendimentos mais elevados e reações mais rápidas. O aumento de R, numa mesma concentração de sacarose, além de maiores rendimentos e reações mais rápidas, leva ainda à diminuição do peso molecular da dextrana de baixo peso que se forma. Do mesmo modo para um mesmo valor de R, o aumento de S_0 também acarreta a diminuição do peso molecular.

Dentre as combinações de variáveis estudadas, obteve-se para $[S_0] = 300 \text{ g/l}$ e $R = 0,02$, dextranas com peso molecular ade-

quado à obtenção de Fe-dextrana. O rendimento destas espécies foi da ordem de 66%, compatível com aquele obtido no processo convencional depois da hidrólise ácida.

VI. RECOMENDACOES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em consequência do levantamento bibliográfico efetuado para execução deste estudo e dos trabalhos experimentais realizados, julgamos oportuno sugerir tópicos para trabalhos futuros, a nível desta instituição ou outros centros de pesquisa.

O estudo cinético da reação enzimática com enzima bruta e purificada na presença ou não de maltose, para uma definição mais apurada da concentração de sacarose a partir da qual a inibição pelo substrato passa a ocorrer.

Seria de grande importância para a utilização de enzima imobilizada um estudo semelhante a este com dextrana-sacarase purificada na forma livre ou não, podendo ser testadas ainda concentrações mais altas de sacarose.

Outro fator que poderia trazer grandes ganhos econômicos neste tipo de processo seria um estudo da recuperação da frutose, produzida em grandes quantidades, em altas concentrações de sacarose, assim como a utilização do HMS da Refinações de Milho Brasil ao invés da maltose.

Para uma análise mais precisa do produto formado, quanto a peso molecular médio, polidispersão e rendimentos obtidos, seria importante o desenvolvimento de técnicas analíticas por cromatografia de permeação em gel mais sofisticadas, com utilização de programas mais adequados de integração dos picos dos cromatogramas.

BIBLIOGRAFIA

01. AQUARDNE, E. Produção de Polissacarídeos. In: LIMA, U.A.; AQUARDNE, E.; BORZANI, W.; Biotecnologia São Paulo, Edgar Blücher, 1975, vol. 1, cap. 6, p.101-106
02. ALSOP, L. Industrial production of dextran". Progress in Ind. Microbiol., 18: 1-44, 1983
03. ALSOP, R.M.; BYRNE, G.A.; DONE, J.N.; EARL, I.E.; GIBBS, R. Quality assurance in clinical dextran manufacture by molecular weight characterisation. Proc. Biochem. 15-35, 1977
04. BAKER, R.W. Methods of fractionation polymers by ultrafiltration. J. of Appl. Polym. Sci. 13: 369-376, 1969
05. BARKER, P.E.; ENGLAND, K.; GANETSOS, G. Fractionation of dextran using repetitive batch chromatography. J. Chem. Tech. Biotechnol. 41: 61-68, 1988
06. BARKER, P.E.; GANETSOS, G.; ENGLAND, K. Dextran fractionation using preparative scale continuous chromatography. J. Chem. Tech. Biotechnol. 46: 209-218, 1989
07. BARKER, P.E.; VLACHOGIANNIS, G. Dextran fractionation on a semi-continuous counter current simulated moving bed chromatography. Chromatographia 17: 149-153, 1983
08. BASEDOW, A.M. Studies on the enzymatic hydrolysis of dextran. Polym Bull. 2: 337-342, 1980

09. BASEDOW, A.M. & EBERT, K.H. Zum mechanismus des abbaes von polymeren in lösung durch ultraschall. Die Makromol. Chem. 176: 745-757, 1975
10. BASEDOW, A.M. & EBERT, K.H. Effects of mechanical stress on the reactivity of polymers: activation of acid hydrolysis of dextran by ultrasound. Polym. Bull. 1: 299-306, 1979
11. United States of America 3.044.940. Cl. 195-31. BEHRENS, U. & RINGPFEIL, M., Leipzig, Germany. Process for enzymatic synthesis of dextran. 17 July, 1962
12. BEHRENS, U. & RINGPFEIL, M. Die technische herstellung von klinischem dextran durch gelenkte synthese in washsender kultur. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 3(2): 199-218, 1961
13. DE BELDER, A.N. Dextran. In: Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Weinheim, W. Gerhart, 1987. vol. A8, p. 449-454
14. BOVEY, F.A. Enzymatic polymerization. I. Molecular weight and branching during the formation of dextran. J. Polym. Sci. 35: 167-182, 1959
15. BRAGA, Z.M.; URRALERO, I.C.B.; ROCHA, A.L. Relatório interno-CODETEC, 1990
16. BRASWELL, E. & STERN, K.G. Studies on the enzymatic synthesis of dextran. J. Polym. Sci. 41: 167-163, 1959

17. BRASWELL, E., GOODMAN, A.; STERN, K.G. Studies on the enzymatic synthesis of dextran Part II: J. Polym. Sci., 61: 143-154, 1962
18. BREMNER, I.; COX, J.S.G.; MOSS, G.F. Structural studies on iron-dextran. Carbohydr. Res. 11: 77-84, 1969
19. BROWN, D.E. & McAVOY, A. A pH controlled fed-batch process for dextransucrase production. J. Chem. Tech. Biotechnol. 48: 405-414, 1990
20. BUSSO, E.M. & RESNICK, L. Anti-human immunodeficiency virus effects of dextran sulfate are strain dependent and synergistic or antagonistic when dextran sulfate is given in combination with dideoxynucleosides. Antimicrob. Ag. and Chemoth. 34(10): 1991-1995, 1990
21. CHARLES, A.F. & FARRELL, L.N. Preparation and use of enzymatic material from *P. lilacinum* to yield clinical dextran. Can. J. Microbiol. 3: 239-247, 1957
22. COX, J.S.G.; KENNEDY, G.R.; KING, J.; MARSHALL, P.R.; RUTHERFORD, D. Structure of an iron-dextran complex. J. Pharm. Pharmac. 24: 513-517, 1972
23. CURRALERO, I.C.B.; AKIRA, R.O.; MALDONADO, I.R.; MAYER, A.F. Dados confidenciais. (CODETEC), 1991

24. DITSON, S.L. & MAYER, R.M. Dextransucrase: the direction of chain growth during autopolymerization. Carbohydr. Res. 126: 170-175, 1984
25. DIMLER, R.J.; DAVIS, H.A.; GILL, G.J. e RIST, C.E. Analytical total acid hydrolysis of dextrans. Anal. Chem. 26: 1142-1146, 1954
26. EBERT, K.H. & SCHENK, G. Mechanisms of biopolymer growth: the formation of dextran and levan. Adv. Enzymol. 30: 179-221, 1968
27. FOSTER, F.H. Dextran Manufacture and use. Proc. Biochem. 3(3): 55-57, 1968
28. GOODMAN, G.A. et al (eds.) In Goodman and Gilman's - The Pharmacological basis of therapeutics, 7^a Ed., vol. 12, MacMillan Publishing Company, NY, 1985
29. GRANATH, K.A. & FLODIN, P. Fractionation of dextran by the gel filtration method. Makrom. Chem. 48: 160-171, 1961
30. GRANATH, K.A. & KVIST, B.E. Molecular weight distribution analysis by gel chromatography on Sephadex. J. Chrom. 28: 69-81, 1967.
31. GREULICH, K.O. & LUDWIG, H. Catalytic properties of the enzyme dextransucrase under high pressure. Hig. Temp. Hig. Press. 9: 541-542, 1977a.

32. GREULICH, K.O. & LUDWIG, H. High pressure enzyme kinetics of dextranucrase. Bioph. Chem. 6: 87-94, 1977b
33. GRIER, J.T. & MAYER, R.M. Dextranucrase: studies on donor substrate specificity. Arch Biochem. Biophys. 212(2): 651-659, 1981
34. United States of America. U. S. Pat. Off. Pat. 2,644,815. Cl. 260-209. GRÖNWALL, A.J.T. & INGELMAN, B.G.A. Uppsala, Sweden. Process for producing dextran products having substantially uniform molecular size for pharmaceutical and therapeutic preparations. 15 Oct, 1948
35. HEHRE, E.J. Production from sucrose of a serologically reactive polysaccharide by a sterile bacterial extract. Science 93: 237 239, 1941.
36. HEHRE, E.J. Studies on the enzymatic syntheses of dextran from sucrose. J. Biol. Chem. 163: 221 - 233, 1946
37. HEHRE, E.J. Low molecular weight dextran as a modifier of dextran synthesis. J. Am. Chem. Soc. 75: 4866, 1953
38. HEHRE, E.J. Polysaccharide synthesis from disaccharides
In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. Methods in Enzymology
New York, Academic Press, 1955, vol. 1, p. 178-184
39. HEHRE, E.J. Natural synthesis of low molecular weight (clinical type) dextran by a *Streptococcus* strain. J. Biol. Chem. 222: 739 750, 1956

40. HEHRE, E.J. The direction of propagation in carbohydrate catalysed polymerizations. J. Polym Sci. 23: 239 - 244 1968
41. HELLMAN, N.N.; TSUCHIYA, H.M.; ROGOVIN, S.P.; LAMBERTS, B.L.; TOBIN, R.; GLASS, C.A.; STRINGER, C.S.; JACKSON, R.W.; SENTI, F.R. Controlled enzymatic synthesis of dextran - Conditions for producing clinically suitable molecular weight. Ind. Eng. Chem. 47: 1593 - 1598, 1955
42. United States of America. U. S. Pat. Off. Pat. 2.726.985, Cl. 195-31. HELLMAN, N.N. & TSUCHIYA, H.M. - Controlled enzymatic synthesis of dextran. 13 Dec. 1955
43. HINES, G.E.; MCGHEE, R.M.; SHURTER, R.A. Dextran. Ind. Eng. Chem. 45: 692 - 705, 1953
44. HOLLÓ, J. & LÁSZLÓ, E. The synthesis of dextran. I. Importance of sucrose concentration in the course of dextran fermentation. Chem. Eng. Per. Polytech. 15(1-2): 35-42, 1971
45. JEANES, A.; WILHAM, C.A.; MIERS, J.C. Preparation and characterization of dextran from *Leuconostoc mesenteroides*. J. Biol. chem. 176: 603-615, 1948
46. JEANES, A.; HAYNES, W.C.; WILHAM, C.A. Characterization of dextran from four types of *Leuconostoc mesenteroides*. J. Bacteriol. 71: 167 - 173, 1956

47. JEANES, A. Dextrans. In: Methods in carbohydrate chemistry. New York, Academic Press, 1967 vol. 5, p. 118-132
48. JEANES, A.; WILHAM, C.A.; JONES, R.W.; TSUCHIYA, H.M.; RIST, C.E. Isomaltose and isomaltotriose from enzymic hydrolyses of dextran. J. Am.chem. Soc. 75: 5911-5915, 1953
49. JEANES, A. Extracelular microbial polysaccharides - New hydrocolloids of interest to the food industry. Food Technol. 28: 34-40, 1974
50. JONES, J.K.N. & WILKIE, K.C.B. Structural Studies on clinical dextrans - Part 1 - Methylation and periodate oxidation studies. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 377-390, 1959
51. JUNG, S.M. & MAYER, R.M. Dextranucrase: donor substrate reactions. Arch. Biochem. Biophys. 208: 288-295, 1981
52. KABOLI, H. & REILLY, P.J. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextranucrase. Biotech. Bioeng. 23: 1055-1069, 1980
53. KATO, Y.; KOMIYA, K.; SASAKI, H.; HASHIMOTO, T. Separation range and separation efficiency in high-speed gel filtration on TSK Gel SW columns. J. Chromat. 190: 297-303, 1980
54. KILLEY, M.; DIMLER, R.J. & CLUSKEY, J.E. Preparation of panose by the action of NRLL B-512 dextranucrase on a

- sucrose-maltose mixture. J. Am. Chem. Soc. 71: 3315-3318, 1955
55. KOBAYASHI, M. & MATSUDA, K. Structural Characteristics of Dextran synthesized by dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRLL B-1299. Agric. Biol. Chem. 41(10): 1931-1937, 1977
56. KOBAYASHI, M. & MATSUDA, K. Characterization of the multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRLL B-512F. Biochim. Biophys. Acta. 614: 46-62, 1980
57. KOBAYASHI, M.; UTSUGI, H. & MATSUDA, K. Intensive U.V. absorption of Dextran and its application to enzyme reactions. Agric. Biol. Chem. 50(4): 1051-1053, 1986
58. KOEPESELL, H.J. & TSUCHIYA, H.M. Enzymatic synthesis of dextran. J. Bact. 63: 293-295, 1952
59. KOEPESELL, H. J.; TSUCHIYA, H.M.; NELLMAN, N.N.; KASENKO, A.; HOFFMAN, C.A.; SHARPE, E.S.; JACKSON, R.W. Enzymatic synthesis of dextran-acceptor specificity and chain initiation. J. Biol. Chem. 200: 793-801, 1952
60. KULA, M.R.; KRONER, K.H.; HUSTEDT, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. Adv. Biochem Eng. 24: 73-118, 1982

61. LANDON, R.S. & WEBB, C. Separating enzyme (Dextranucrase) production and product (dextran) synthesis within a traditional fermentation process. Proc. Biochem. 19-23, 1990
62. United Kingdom. Pat. 2.006.243. Lane E.S. London Eng. Improvements in or relating to compounds. 2 May 1979
63. LAURENT, T.C. & GRANATH, K.A. Fractionation of dextran and ficoll by chromatography on Sephadex G-200. Biochim. Biophys. Acta. 136: 191-198, 1967
64. LAWFORD, G. R.; KLIGERMAN, A.; WILLIAMS, T. Dextran biosynthesis and dextranucrase production by continuous culture of *Leuconostoc Mesenteroides*. Biotech. Bioeng. 21: 1121-1131, 1979
65. LOPES, A. Production, purification et immobilization de la dextrana-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides*. Produção, purificação e imobilização da dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides*. Toulouse, 1979. Tese (Docteur Ingenieur) Institut National des Sciences Appliquees. (INSA)
66. LUZIO, G.A.; PARNAIK, V.K.; MAYER, R.M. A D-glucosylated form of dextranucrase: demonstration of partial reactions. Carbohydr. Res. 121: 269-278, 1983
67. WADE, A. Dextrans. In: MARTINDALE The Extra Pharmacopoeia, London, The Pharmaceutical Press, 1982 p. 511-512

68. MARTINEZ-ESPINDOLA, J.P. & LOPES-MUNGUIA, C.A. On the kinetics of dextransucrase and dextran synthesis in batch reactions. Biotech. Lett. 7(7): 483-486, 1985
69. MILLER, A.W. & ROBYT, J.F. Stabilization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F by non ionic detergents, poly(ethylene glycol) and high-molecular weight dextran. Biochim. Biophys. Acta. 785: 89-96, 1984
70. MILLER, A.H.; ERLUND, S.H.; ROBYT, J.F. Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. Carbohydr. Res. Res. 147: 119-133, 1986
71. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31(3): 426-428, 1959
72. MONSAN, P. & LOPEZ, A. On the production of dextran by free and immobilized dextransucrase. Biotech. Bioeng. 23: 2027-2037, 1981a
73. MONSAN, P. & LOPEZ, A. Dextran production by free and immobilized dextransucrase. Adv. Biotechnol. 1: 679-684, 1981b
74. NADEL, H.; RANGLES, C.I. e STAHLY, G.L. The influence of environmental factors on the molecular size of dextran. Appl. Microbiol. 1: 217-224, 1953

75. NEELY, W.B. Inhibition of dextranucrase by excess substrate. Nature 182: 1007-1008, 1958
76. NEELY, W.B. Studies on the enzyme dextranucrase. II - Role of raffinose as an acceptor. Arch. Biochem. Biophys. 79: 154-161, 1959
77. NEELY, W.B. Dextran - Structure and Synthesis. Adv. Carbohydr. Chem. 15: 341 - 369, 1960
78. NILSSON, G. & NILSSON, K. Molecular-weight distribution determination of clinical dextran by gel permeation chromatography. J. Chromat. 101: 137-153, 1974
79. United States of America. U. S. Pat Off. Pat. 2.972.567. Cl. 195-31. NOVAK, L.J. & WITT, E.E. Ohio, USA. Method of producing clinical dextran. 21 Feb. 1961
80. OGINO, S. Formation of the fructose-rich polymer by water insoluble dextranucrase and presence of a glycogen value lowering factor. Agr. Biol. Chem. 34(8): 1268-1271, 1970
81. ORIOL, E.; PAUL, F. e MONSAN, P. Transfer reactions of glucosyl residues to maltose and pure oligosaccharides using highly active *L. mesenteroides* NRRL B 512 F dextranucrase; Relatório técnico. Toulouse, INSA, 1984, 10 p.
82. OLMO, D.A. Dextrana técnica. In: TAUPIER, L.D.G., coord. La industria de los derivados de la caña de azúcar La Habana, Inst. Cubano de investigaciones de los derivados de la caña de azúcar, 1972, cap. 13, p. 350-359

83. PARNAIK, V.K.; LUZIO, G.A.; GRAHANE, D.A.; DITSON, S.L.;
MAYER, R.M. A D-glucosylated form of dextranucrase:
preparation and characteristics. Carbohydr. Res. 121: 257-
268, 1983
84. PAUL, F.; AURIOL, D.; ORIOL, E.; MONSAN, P. Production and
purification of dextranucrase from *Leuconostoc mesente-
roides*, NRRL B512 (F); Third European Symposium, on Carbo-
hydrates, Grenoble, 16-20 Sep. 1985
85. PAUL, F.; ORIOL, E.; AURIOL, D.; MONSAN, P. Acceptor reaction
of a highly purified dextranucrase with maltose and
oligosaccharides application to the synthesis of controlled
molecular weight dextrans. Carbohydr. Res. 149: 433-441,
1986
86. PRAT, D.; VALDIVIA, L.A.; MONSAN, P.; PAUL, F.; LOPEZ-MUNGUIA,
C.A. Effect of borate ions on dextranucrase acceptor
reaction. Biotechnol. Lett. 9(1): 1-6, 1987
87. QUEIROZ, J.H. & MAUGERI, F. Otimização da produção de dex-
trana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* a partir de
melaço como fonte de carbono. Rev. Microbiol. 20(2): 150-
156, 1989
88. QUEIROZ, JOSÉ HUMBERTO Contribuição ao estudo da produção
de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides*. Campi-
nas, 1987 118p. Tese de mestrado apresentada na Faculdade
de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Cam-
pinas

89. ROBYT, J.F.; KIMBLE, B.K.; WALSETH, T.F. The Mechanism of dextran-1,6-glucosyltransferase action. Direction of dextran biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys. 165: 634-640, 1974
90. ROBYT, J. F. & TANIGUCHI, H. The Mechanism of dextran-1,6-glucosyltransferase action. Biosynthesis of branch linkages by acceptor reactions with dextran. Arch. Biochem. Biophys. 174: 129-135 (1976)
91. ROBYT, J.F. & CORRIGAN, A.J. The mechanism of dextran-1,6-glucosyltransferase action - Activation of dextran-1,6-glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* DMZ 176 by dextran and modified dextran and the non-existence of the primer requirement for the synthesis. Arch. Biochem. Biophys. 183: 726-731, 1977
92. ROBYT, J. F. & WALSETH, T. F. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B - 512 F dextran-1,6-glucosyltransferase. Carbohyd. Res. 61: 433-445, 1978
93. ROBYT, J. F. & WALSETH, T. F. Production, purification and properties of dextran-1,6-glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512 F. Carbohyd. Res. 68: 95-111, 1979
94. ROBYT, J. F. & EKLUND, S. H. Stereochemistry involved in the mechanism of action of dextran-1,6-glucosyltransferase in the synthesis of dextran and the formation of acceptor products. Bioorg. Chem. 11: 115-132, 1982

95. ROBYT, J. F. & EKLUND, S. H. Relative quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B - 512 F dextransucrase. Carbohyd. Res. 279-286, 1983
96. SABATIE, J.; CHOPLIN, L.; PAUL, F.; MONSAN P. The effect of synthesis temperature on the rheological properties of native dextran. Biotechnol. Lett. 8(6): 425-430, 1986
97. United Kingdom. Pat. 2.079.290. SCHNEIDER, M.; GUILLOT, C.; AYERBE, A. Preparation and purification process. 20 Jan. 1982
98. SERY, T.W. & HEHRE, E.J. Degradation of dextrans by enzymes of intestinal bacteria. J. Bacteriol. 71: 373-380, 1956
98. SIDEBOTHAM, R.L. Dextrans. Adv. Carbohyd Chem. Biochem. 30: 371-444, 1974
100. SIDEBOTHAM, R.L.; WEIGEL, H.; BOWEN, W.H. Studies on dextrans and dextranses. Part IX. Dextrans elaborated by cariogenic organisms. Carbohyd. Res. 19: 151-159, 1971
101. SMILLEY, K.L.; SLODKI, M.E.; BOUNDY, J.A.; PLATTNER, R.D. A simplified method for preparing linear isomalto-oligo saccharides. Carbohyd. Res. 108: 279-283, 1982
102. SMITH, E. E. Biosynthetic relation between the soluble and insoluble dextrans produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 1299. FEBS Lett. 12(1): 33-37, 1970

103. STACEY, M. Enzymatic production of bacterial polysaccharides.
Nature 149: 639, 1942
104. STACEY, M. & PAUTARD, F. G. Thermal degradation of dextran.
Chem. Ind. 1058-1059, 1952
105. STRINGER, C.S. & TSUCHIYA, H.M. A kinetic study of dextran-
sucrase. J. Am. Chem. Soc. 80: 6620-6625, 1958
106. SUN, S.F. & WONG, E. Modified method of universal calibration
for the determination of molecular weight and molecular
weight distribution. J. Chromat. 208: 253-259, 1981
107. TAILLANDRER, P. Glycosylation de polyglucane par la dextrane-
saccharase de Leuconostoc mesenteroides NRRL B - 512 F.;
relatório técnico Toulouse, Institut National des Sciences
Appliquees, 1986 35 p.
108. TSUCHIYA, H. M.; KOEPSSELL, H. J.; CORMAN, J.; BRYANT, G.;
BOGARD, M. O.; FEGER, V. H.; JACKSON, R. W. The effect
of certain cultural factors on production of dextran-
sucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. J. Bacteriol. 64:
521-526, 1952
109. TSUCHIYA, H.M.; JEANES, A.; BRICKER, H.M.; WILHAM, C.A.
Dextran degrading enzymes from molds. J. Bacteriol. 64:
513-519, 1952
110. TSUCHIYA, H.M.; HELLMAN, N.N.; KOEPSSELL, H.J. Factors
affecting molecular weight of enzymatically synthesized
dextran. J. Am. Chem. Soc. 75: 757-758, 1953

111. TSUCHIYA, H.M.; HELLMAN, N.N.; KOEPESELL, H.J.; CORMAN, J.;
STRINGER, C.S.; ROGOVIN, S.P.; BOGARD, M.O.; BRYANT, G.;
FEGER, V.H.; HOFFMAN, C.A.; SENTI, F.R.; JACKSON, R.N.
Factors affecting molecular weight of enzymatically
synthesized dextran. J. Am. Chem. Soc. 77: 2412-2419, 1955
112. TSUCHIYA, H. M. Dextranucrase. Bull Soc. Chem. Biol. 42(12):
1778-1788, 1960
113. TSUMURAYA, Y.; NAKAMURA, N.O.; KOBAYASHI, T. Dextranucra-
se, and the role of metallic ions in the formation of branch
links in dextran synthesis. Agric. Biol. Chem. 40(8): 1471-
1477, 1976
114. WALES, M.; MARSHALL, P. A.; WEISSBERG, S. G. Intrinsic
viscosity - molecular weight relationships for dextran. J.
Polym. Sci. 10(2): 229-240, 1953
115. WAN, K. K. & TSALLAS, G. Dilute iron dextran formulation for
addition to parenteral nutrient solutions. Am. J. Hosp.
Pharm. 37: 206-210, 1980
116. WHITESIDE-CARLSON, V. & CARLSON, W.W. The vitamin requi-
rements of *Leuconostoc* for dextran synthesis. J.Bacteriol.
58: 135-141, 1949
117. WILKIE, K.C.B.; JONES, J.K.N.; EXCELL, B.J.; SEMPLE, R.E.
The fractionation of polysaccharides by the method of
ultrafiltration. Can. J. Chem. 35: 795-798, 1957

118. WOLFF, I. A.; WATSON, P. R.; SLOAN, J. W.; RIST, C. E. Controlled thermal depolymerization of dextran. Ind. Eng. Chem. 45: 755-759, 1953
119. WOLFF, I.A.; MEHLTRETTER, C.L.; MELLIES, R.L.; WATSON, P. R.; HOFREITER, B.T.; PATRICK, P.L.; RIST, C.E. Production of chemical type dextran - Partial hydrolytic depolymerization and fractionation of the dextran from *Leuconostoc mesenteroides* strain NRRL B-512. Ind. Eng. Chem. 46: 370-377, 1954
120. VELJKOVIC, B.V.; LAZIC, M.L. - SKALA, D.U. Studies on dextran fermentation broth rheology. Enzyme Microb. Technol. 10: 686-683., 1988
121. ZIEF, M.; BRUNNER, G.; METZENDORF, J. Fractionation of partially hydrolyzed dextran. Ind. Eng. Chem. 48: 119-121, 1956.